



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Evaluación de la eficacia de una vacuna vectorizada
para el control de Newcastle aplicada en pollos bb en
planta**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Sanidad Avícola

AUTOR

María Mercedes SIALER GARCÍA

ASESOR

Dr. Armando Emiliano GONZÁLEZ ZARIQUIEY

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sialer M. Evaluación de la eficacia de una vacuna vectorizada para el control de Newcastle aplicada en pollos bb en planta [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria. Unidad de Posgrado; 2017.

Hoja de metadatos complementarios

- **Código ORCID del autor:**
0000-0003-2328-1135
- **Código ORCID del asesor:**
0000-0003-1909-1873
- **DNI o pasaporte del autor:**
10140530
- **Grupo de investigación:**
Ateneo, abocado a responder amenazas y oportunidades del sector pecuario
- **Institución que financia la investigación:**
San Fernando
- **Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación:**
Laboratorio de Patología aviar 12.081578, -76.986609
Av. Circunvalación 2800, San Borja
- **Año o rango de años que la investigación abarcó:**
2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON MENCIÓN EN SANIDAD AVÍCOLA**

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 11:00 horas del día martes 12 de diciembre de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el Dr. Miguel Ángel Ara Gómez y constituido por los siguientes miembros: Dr. Armando González Zariquiey (Asesor), Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández, Mg. María Eliana Icochea D'Arrigo, Mg. Manolo Fernández Díaz, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Evaluación de la eficacia de una vacuna vectorizada para el control de Newcastle aplicada en pollos BB en planta", presentado por la M.V.

MARÍA MERCEDES SIALER GARCÍA

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (17) DIECISIETE** _____

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó que la Facultad de Medicina Veterinaria proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola, a la **M.V. MARÍA MERCEDES SIALER GARCÍA.**

Siendo las 13:00 horas del día martes 12 de diciembre de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Dr. Miguel Ángel Ara Gómez (P.P.D.E.)
Presidente

.....
Mg. Manolo Fernández Díaz
Miembro (Externo)

.....
Dr. Abelardo L. Maturrano Hernández (P.A.T.C.)
Miembro

.....
Mg. Eliana Icochea D'Arrigo (P.P.T.C.)
Miembro

.....
Dr. Armando González Zariquiey (P.P.D.E.)
Miembro (Asesor)

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

DEDICATORIA

A Dios

A Él se lo debo todo.

A mi Madre querida

Por su gran amor y comprensión, por dejarme ser.

A mis padres Abelardo y Dante

Por permitirme ser su hija y regalarme tanto amor.

A Oscar

Por su amor, su alegría y su gran ternura, por su apoyo incondicional

A mis hermanos Adriana, Ismael, Carmen y Francisco

Por ser siempre mi referencia en lo personal y profesional.

María Mercedes

AGRADECIMIENTO

A mi casa de estudios, la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, por la formación profesional recibida, con mención especial a los Dres. Arturo Salas, Pablo Reyna y Hans Ploog.

A mi Asesor de tesis, Dr. Armando Gonzáles por su orientación, paciencia y apoyo para el presente trabajo

A la Dra. Eliana Icochea por su constante e invaluable asesoramiento y motivación para el desarrollo de esta tesis

A los Dres. Luis Cesti, Luis Alzamora, por su apoyo en la investigación del presente trabajo.

A mis compañeros de estudios, Especialidad y Maestría, Magali Salas, Susana Fribourg, Mónica Alba, Nancy Moreno, Raúl Guillermo, César Reyes, Branko Alva, Antonio Cobián, Elmer Dávila, Francisco Alva, César Taipe, Iván Camargo, Víctor Rodríguez, Virgilio Pacheco y Xavier Castro-Pozo, por su acompañamiento en momentos especiales para mí y por su amistad

A mis amigos de siempre, Roxana Ribeyro, Judy Alegría, Betty Goyburo, Mery Clavo, Lucy Raygada, Arturo Vargas, Enrique Angulo, Alfonso Escajadillo, Jorge Alvarado, Willy Tomasevich y Carlos Cueva, gracias por estar siempre para mí

Mi inmensa gratitud a todos ustedes.

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE	iv
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
APENDICE.....	x
I. RESUMEN.....	xi
II. ABSTRACT	xii
III. INTRODUCCION.....	13
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
1. Generalidades	14
2. Definición de la Enfermedad de Newcastle	15
3. Historia	16
4. Morfología viral	18
a. Por antigenicidad	18
b. Por inmunogenicidad.....	19
c. Por genética o Molecular	19
d. Por patogenicidad	19
5. Impacto Económico.....	21
6. Epidemiología	21
7. Transmisión	24
8. Signos Clínicos.....	24
9. Hallazgos anatomopatológicos.....	25
10. Diagnóstico y Tratamiento	26
a. Identificación del agente.....	26
b. Supervivencia del virus de la ENC	27
11. Vacunación	29
a. Vacunas contra el vENC vectorizadas.....	33
V. MATERIAL Y METODOS	35
1. Lugar de estudio y periodo de ejecución:.....	35
2. Descripción del material experimental:.....	35
a. Tamaño muestral	35
b. Diseño experimental	35
c. Alimentación	35

d. Vacunas evaluadas.....	36
e. Desafío viral	36
f. Equipos de crianza:.....	36
3. Parámetros evaluados:.....	37
a. Reacciones post vacunales 1 a 21 días de edad	37
b. Mortalidad y signos clínicos post desafío.....	37
c. Respuesta serológica.....	38
4. Análisis de datos.....	38
5. Consideraciones éticas	38
VI. RESULTADOS	40
1. Reacciones post vacunales	40
2. Signos clínicos y mortalidad post desafío	42
3. Lesiones post desafío.....	63
4. Serología.....	63
VII. DISCUSION.....	63
VIII. CONCLUSIONES.....	71
IX. LITERATURA CITADA.....	73
X. APENDICE	82

LISTA DE CUADROS

• Cuadro 1.	Clasificación serológica de los distintos Paramixovirus aviares	Pág. 15
• Cuadro 2.	Tiempo de supervivencia del vENC en diferentes tipos de heces en función a la temperatura.	28
• Cuadro 3.	Tiempo de supervivencia del virus de la ENC en el agua a diferentes temperaturas	28
• Cuadro 4.	Tiempo de supervivencia del vENC en el suelo en función de la humedad relativa y la temperatura	29
• Cuadro 5.	Ocho cepas usadas en las vacunas contra la enfermedad de Newcastle con virus vivo	31
• Cuadro 6.	Número de brotes y política nacional de control del vENC en el período 1990-1997	32
• Cuadro 7.	Programa de vacunas empleadas en el experimento	36
• Cuadro 8.	Porcentaje de estornudos y ronquera hasta los 21 días de edad	37
• Cuadro 9.	Evaluación de severidad de estornudos y ronquera hasta los 21 días de edad	37
• Cuadro 10.	Porcentaje diario de aves con reacción post vacunal de estornudos y ronquera evaluados desde el día 1 hasta los 21 días de edad	41
• Cuadro 11.	Grados promedios de severidad de reacción post vacunal estornudos y ronquera desde el día 1 hasta los 21 días de edad	42
• Cuadro 12.	Tiempo de presentación de mortalidad y signos clínicos	43
• Cuadro 12.	Porcentajes de mortalidad total y signos clínicos hasta los 45 días de edad	43

• Cuadro 14.	Número de aves muertas post desafío viral y porcentajes totales de mortalidad según tratamientos experimentales	44
• Cuadro 15.	Modelo de regresión logística para la evaluación del odds ratio (OR) de mortalidad en aves post-desafío según tratamientos experimentales ^{a,b}	44
• Cuadro 16.	Porcentajes de depresión post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	45
• Cuadro 17.	Porcentajes de diarrea post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	45
• Cuadro 18.	Porcentajes de edema facial post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	46
• Cuadro 19.	Porcentajes de secreción post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	46
• Cuadro 20.	Porcentajes de ronquera post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	46
• Cuadro 21.	Porcentajes de secuelas nerviosas post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales	47
• Cuadro 22.	Respuesta serológica contra el virus de la enfermedad de Newcastle mediante ELISA en aves a los 26 días de edad según tratamientos experimentales	63
• Cuadro 23.	Respuesta serológica contra el virus de Newcastle mediante ELISA en aves a los 42 días de edad (post desafío) según tratamientos experimentales	64

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
• Figura 1. Severa hemorragia difusa en proventrículo en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post desafío viral.	48
• Figura 2. Hemorragia difusa en la molleja de un ave del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post desafío viral.	49
• Figura 3. Esplenomegalia y congestión del bazo (A). Hemorragia en serosa de intestinos y tonsilas cecales en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post desafío viral.	50
• Figura 4. Severa hemorragia en tonsilas cecales de aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post desafío viral.	51
• Figura 5. Leve (A) y severa (B) hemorragia difusa en proventrículo de aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post desafío viral.	52
• Figura 6. Severa hemorragia difusa (A), moderada hemorragia multifocal (B) y leve hemorragia focal (C) en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post desafío viral.	53
• Figura 7. Hemorragia en serosa intestinal (A), proventrículo (B) y en tonsilas cecales (C) en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post desafío viral.	54
• Figura 8. Severa hemorragia en tonsilas cecales en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post desafío viral.	55
• Figura 9. Mollejas con presencia de alimento (A) y severa hemorragia del proventrículo en un ave (B) del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post desafío viral.	56
• Figura 10. Leve a moderada hemorragia en proventrículo en un ave del tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post desafío viral	57
• Figura 11. Hemorragia en serosa cecal y tonsilas (A), hemorragia en agregados linfoides de intestino medio (B y C) en aves del	

	tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post desafío viral	58
•Figura 12.	Severa hemorragia en tonsilas cecales en aves del tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post desafío viral.	59
•Figura 13.	Ausencia de hemorragia en proventrículo de aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post desafío viral	60
•Figura 14.	Ausencia de hemorragia en agregados linfoides en aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post desafío viral	61
•Figura 15.	Hemorragias en tonsilas cecales en aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post desafío viral	62

APENDICE

Anexo 1.	82
Anexo 2.	84
Anexo 3.	98
Anexo 4.	99

I. RESUMEN

Las aves son susceptibles a una serie de enfermedades infecciosas que afectan su productividad, dentro de ellas la enfermedad de Newcastle es considerada como una de las más importantes porque las cepas velogénicas del virus tienen un gran impacto sanitario sobre la industria avícola, siendo una enfermedad notificable a la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Los programas de vacunación para prevenir y controlar la enfermedad causada por este tipo de cepas velogénicas son diversos y varían en función del riesgo sanitario de la granja, muchos de ellos requieren de varias aplicaciones de vacunas durante la campaña de crianza de las aves, usualmente al 1, 10 y 28 día de edad, este manejo podría generar un stress en los pollos y originar mermas en el rendimiento productivo del lote en el largo plazo. La genética actual ha hecho que los pollos de engorde de conformación sean altamente susceptibles a condiciones de estrés, por lo que existe la necesidad de inmunizar a las aves contra todos los agentes en planta de incubación evitando el stress de la vacunación y los riesgos que ésta conlleva. La hipótesis de la tesis es que la vacuna contra la enfermedad de Newcastle vectorizada en el virus HVT de la enfermedad de Marek aplicada a pollos al primer día de edad en planta de incubación protege contra cepas patógenas del vENC. Se realizó un Ensayo Clínico que probó la vacuna vectorizada en Marek comparándola con otros esquemas de vacunación y un grupo control. Las aves se desafiaron a los 26 días post vacunación, con una cepa velogénica de campo y se registraron los efectos adversos y la eficacia de las vacunas. El esquema con la mejor protección y el menor número de eventos adversos fue la vacuna vectorizada con Marek.

Palabras clave: Enfermedad de Newcastle, vacuna vectorizada, pollos, velogénica

II. ABSTRACT

The birds are susceptible to a series of infectious diseases that affect their productivity, among them the Newcastle disease is considered one of the most important because the velogenic strains of the virus have a great sanitary impact on the poultry industry, being a notifiable disease to the World Organization for Animal Health (OIE). Vaccination programs to prevent and control the disease caused by this type of velogenic strains are diverse and vary depending on the health risk of the farm, many of them require several applications of vaccines during the campaign of raising the birds, usually at 1, 10 and 28 days of age, this management could generate stress in the chickens and cause losses in the productive performance of the lot in the long term. The current genetics has made conformation broilers highly susceptible to stress conditions, so there is a need to immunize birds against all agents in the hatchery avoiding the stress of vaccination and the risks that this it entails The hypothesis of the thesis is that the vaccine against Newcastle disease vectorized in the HVT virus of Marek's disease applied to chickens at the first day of age in the incubation plant protects against pathogenic vENC strains. A Clinical Trial was carried out that tested the vectorized vaccine with Marek comparing it with other vaccination schemes and a control group. The birds were challenged 26 days post vaccination, with a field velogenic strain and the adverse effects and efficacy of the vaccines were recorded. The scheme with the best protection and the lowest number of adverse events was the Marek vectorized vaccine.

Keyword: Newcastle disease, vectored vaccine, chickens, velogenic

III. INTRODUCCION

La industria aviar es de gran importancia en el Perú, la crianza de pollos en el 2016 alcanzó un promedio cercano a los 58 millones de unidades mensuales, lo que permitió duplicar el consumo mensual registrado hace diez años. La crianza de pollos se enfrenta a varios desafíos sanitarios, entre ellos la enfermedad de Newcastle (ENC), altamente contagiosa causada por el virus Paramyxovirus aviar serotipo 1 (APMV-1), el impacto a la industria avícola es muy fuerte. El control de la ENC se hace por vacunación y estrictas medidas de bioseguridad. Empero, los programas de vacunación contra la enfermedad que incluyen varias vacunas vivas reactivas pueden atentar contra la productividad y eventualmente algunas aves vacunadas eliminar el virus vacunal durante la crianza de los pollos. La hipótesis de la tesis es que la vacuna vectorizada contra la ENC aplicada en planta de incubación a pollos de 1 día de edad protege contra cepas patógenas del virus produciendo menores efectos adversos que las alternativas de uso corriente. Consecuentemente, un primer objetivo de la tesis es comparar la eficacia de un programa usando una vacuna vectorizada en Marek aplicada a pollos de un día de edad, en planta de incubación, contra dos grupos control: a) un grupo sin vacuna y b) un control positivo que empleó dos programas de vacunación convencionales y de uso común en la industria.

El estudio comprende un ensayo clínico donde se evaluó la vacuna vectorizada contra el virus de Newcastle, aplicada en planta de incubación, el que es comparado con estándares de uso actual y un grupo control. A los veintiséis días después de haber vacunado las aves, de los cuatro grupos, fueron desafiadas con una cepa velogénica viscerotrópica del virus aislada de un brote de campo, se registraron la mortalidad y los efectos adversos en las aves.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Generalidades

Es un paramixovirus aviar – APMV 1 por las siglas en inglés - el causante de la enfermedad de Newcastle (ENC). Los virus de las familias Bornaviridae , Paramyxoviridae, Filoviridae y Rhabdoviridae forman el orden de los Mononegavirales (Suarez, 2013) y se caracterizan por tener genomas no segmentados. La taxonomía y nomenclatura de la familia Paramyxoviridae fue modificada en el 7^{mo} reporte del Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV 2012), clasificándose en dos subfamilias la Paramyxovirinae y la Pneumovirinae. El virus de la enfermedad de Newcastle pertenece a la sub familia Paramyxovirinae, género Avulavirus (Lamb *et al.*, 2000; Mayo, 2002)

Inicialmente, se aislaron nueve Paramixovirus que fueron identificados como serotipos APMV-1 al APMV-10 (Alexander *et al.*, 1997). Posteriormente fueron descritos 11 tipos de paramixovirus aviares, APMV 1 al 11 (Fornells *et al.*, 2012; Suarez, 2013). Actualmente son reconocidos los serotipos APMV – 12, APMV – 13, APMV – 14, el último aislado de una muestra fecal de pato en Japón. De estos Paramixovirus, el virus de la ENC (APMV 1) es el más importante para la industria avícola, pero se sabe que los otros Paramixovirus APMV 2, APMV 3, APMV 6 y el APMV 7 causan enfermedad en aves principalmente en silvestres, patos o pavos (Alexander, 2003). Específicamente, el Paramixovirus aviar tipo 1 (AMPV-1) género Avulavirus es el causante de la enfermedad de Newcastle (Alexander, 2003).

El Cuadro 1 presenta once de los serotipos de Paramixovirus aviares (APMV).

Cuadro 1. Clasificación serológica de los distintos Paramyxovirus aviares

Serotipo	Hospedador Natural
APMV-1	Varios que producen ND
APMV-2/chicken/California/Yucaipa 56	Pavos
APMV-3/turkey/Wisconsin/68	Pavos
APMV-3/parakeet/Netherlands/449/75	Psitácidas
APMV-4/duck/Hong Kong/D3/75	Patos
APMV-5/budgerigar/Japan/Kunitachi/74	Psitácidas
APMV-6/duck/Hong Kong/199/77	Patos
APMV-7/dove/Tennessee/4/75	Palomas, pichones
APMV-8/goose/Delaware/1053/76	Patos y gansos
APMV-9/domestic duck/New York/22/78	Patos
APMV-10/penguin/Falkland Islands/324/2007	Pingüinos
APMV-11/common snipe/France/100212/2010	Agachadiza

2. Definición de la Enfermedad de Newcastle

La enfermedad de Newcastle es una de las enfermedades más importantes a nivel mundial por su alta mortalidad y amplia distribución (Wakamatsu *et al.*, 2006). La enfermedad puede causar hasta un 100% de mortalidad en los lotes afectados sumando a ello el impacto económico que implican las restricciones para las exportaciones y el embargo comercial al país afectado. (Bogoyavlenskiy *et al.*, 2009). Es una enfermedad en extremo contagiosa similar a la Influenza aviar, ambas son de notificación obligatoria a la OIE, con la finalidad de disminuir su dispersión a otros países y permitir un mejor control de la enfermedad en el ámbito mundial. (Alexander, 2008).

La ENC es producida por el Paramyxovirus aviar serotipo 1 (APMV-1)(Gallili y Ben-Nathan, 1998; Miller *et al.*, 2010), la definen como la infección causada por el virus que reúne los siguientes criterios (Miller y Koch, 2013):

1. El virus tiene un Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI) en pollitos bb de un día de edad, igual o mayor que 0.7

2. En el virus de la ENC, se han demostrado Aminoácidos básicos múltiples (directamente o por deducción) en el extremo terminal del Carboxilo de la Proteína F2 y fenilalanina en el extremo terminal Nucleótido de la Proteína F1. Los Aminoácidos citados son la arginina o lisina, estando al menos a 3 residuos de uno u otro entre los residuos 113 a 116. No siempre se puede demostrar esta particular secuencia de aminoácidos y ante este inconveniente hay que identificar el virus aislado a través de la determinación del IPIC.

Presumiblemente, la extensa variedad de aves existentes en el mundo sean susceptibles de ser infectadas con el virus de la enfermedad de Newcastle de baja o alta virulencia. Así mismo existe una pluralidad de signos clínicos que están condicionados a ciertos factores como: el tipo de virus, el huésped, la edad del hospedador, la infección con otros organismos, el estrés ambiental y el estado inmunológico. En algunas circunstancias la infección con los virus extremadamente virulentos puede dar lugar a una súbita mortalidad elevada con comparativamente pocos signos clínicos (Alexander, 2008). La forma virulenta de la enfermedad de Newcastle puede ocasionar severos brotes de la enfermedad en la industria (Alexander, 2001a), aunque el mayor impacto de la enfermedad es en la crianza de aves de traspatio en zonas rurales (Spradbrow, 1992), que constituyen un riesgo para la producción aviar en el mundo, particularmente en los países en desarrollo (Cross, 1991).

El vENC muestra un rango considerable de virulencia, igualmente los signos clínicos son variables dependiendo de la influencia de otros factores, por lo que ningún signo puede ser considerado como patognomónico, incluso en huéspedes muy susceptibles como son los pollos.

En la actualidad, la descripción de la enfermedad de Newcastle en todos los estados de la comunidad europea se puntualiza la Directiva 92/66/CEE (Off.J.European Communities, 1992).

3. Historia

La historia de la ENC empezó en 1926 con la descripción de brotes altamente patogénicos en dos lugares del mundo, Newcastle upon Tyne (Inglaterra, UK) (Doyle, 2014) y en la isla de Java (Kraneveld, 1926a). Aunque el término enfermedad de Newcastle fue propuesto por Doyle como una medida temporal, perduró en el tiempo y todavía se usa (Doyle, 1935). El primer brote compatible con la enfermedad fue reconocido como proceso morbosos diferente que afecta las aves y por ello se denominó enfermedad de Newcastle en 1926. Empero, hay informes con fecha anterior a 1926 que reportan brotes similares en Europa central (Halasz, 1912). De hecho,

(Mcpherson, 1956) se atribuye la muerte de todos los pollos en las islas occidentales de Escocia en 1896 a la ENC. Se sabe que, poco después del primer brote descrito en 1926 se reportaron brotes similares en Java, Indonesia (Kranefeld, 1926b), y en Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra (Doyle, 1927). En la década de 1930, una enfermedad respiratoria relativamente suave, a menudo con síntomas nerviosos, fue reportada por primera vez en Estados Unidos y fue denominada neumoencefalitis (Beach, 1942). Se demostró que era debido a un virus indistinguible de Newcastle en pruebas serológicas (Beach, 1944). Desde entonces, numerosos aislamientos del vENC que producen una enfermedad muy leve o sin evidencia de enfermedad en los pollos, se han aislado en todo el mundo (Alexander, 2008). El sinónimo Paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1) fue sugerido por Tumova mucho después para distinguir el vENC de otros serotipos de Paramixovirus aviares (Miller y Koch, 2013; Tumova et al., 1979). El nombre, de enfermedad de Newcastle, se siguió utilizando aun cuando el sinónimo 'Paramixovirus aviar tipo 1' (APMV-1) es reconocido también en la actualidad (Alexander, 2008).

El patrón de los brotes que se deben al virus virulento de la ENC (vvENC) en todo el mundo sugiere que varias panzootias se han producido en las aves de corral desde 1926. La primera se extendió muy lentamente a través del mundo, al parecer, desde el Lejano Oriente. Probablemente tomó más de 20 años para convertirse en una verdadera panzootia y probablemente nunca llegó a las aves de corral en los EE.UU. El comienzo de la segunda panzootia fue reconocida al final de la década de 1960 y en un plazo de cuatro años había llegado a todos los rincones del mundo (Alexander, 2008). Las causas que justifican las diversas tasas de expansión están ampliamente relacionadas con el acrecentamiento de la producción avícola a escala mundial. La comercialización de los alimentos de aves de corral parece haber sido el principal medio de dispersión entre comunidades diferentes, porque los vehículos de reparto de alimentos se mueven de una zona a otra. Otro factor fue la revolución producida en el transporte mundial. El transporte aéreo en particular dio lugar a un enorme y creciente comercio de aves en cautiverio. La importación de aves enjauladas fue la responsable de la introducción del virus en las aves de corral en la panzootia de California (Francis, 1973). La mayor parte de los brotes que ocurrieron en Estados Unidos en el período 1970-1972 se relacionaron a las importaciones de aves exóticas (Francis, 1973; Walker *et al.*, 1973).

4. Morfología viral

Las partículas virales del vENC son viriones pleomórficos, pero pueden parecer redondos con un diámetro de 100 a 500 nm o filamentosos con un diámetro de 100 nm y de longitudes variables (Jordan, 1990). La cara exterior del virus está revestida por proyecciones de dimensiones desiguales (Jordan, 1990), la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) tienen 17 nm de largo y se encuentran en altas densidades en la superficie del virión, estas muestran una simetría helicoidal, pudiendo ser observadas libres o emergiendo de la partícula viral (Alexander, 2003). Al microscopio electrónico, la nucleocápside se puede advertir, con apariencia de espina de pescado alrededor de 18 nm de ancho y un grado de inclinación de 5 nm. (Jordan, 1990) y se asocia con la fosfoproteína (P) y la proteína polimerasa (L) (Miller y Koch, 2013). Los miembros de la familia Paramyxoviridae tienen una cubierta lipídica de doble capa que se origina cuando el virus protruye de la membrana plasmática de la célula en la que se ha replicado (Suarez, 2013).

Clasificación de las cepas del virus de la Enfermedad de Newcastle

a. Por antigenicidad

Todas las cepas de Paramyxovirus Aviar 1 (APMV-1) pertenecen a un solo serotipo, sin embargo, pequeñas variaciones antigénicas entre diferentes aislamientos del virus de la ENC han sido demostradas por anticuerpos monoclonales (Miller y Koch, 2013). Inicialmente antes de la existencia de métodos moleculares que clasifican las cepas del virus en genotipos, fueron usados anticuerpos monoclonales que colocaban las cepas dentro de grupos sobre las bases de su capacidad a reaccionar con diferentes anticuerpos monoclonales, así mismo este método fue usado para identificar a la cepa pigeon. El método de anticuerpos monoclonales clasificó a las cepas en 11 grupos, los grupos A, B y C1 comprendían a los virus velogénicos, los grupos C2, D, E, F, G, H y L comprendían a los virus lentogénicos y el grupo P al virus paloma.

Se han reportado pruebas que la variación antigénica de los virus de la ENC [APMV-1] es detectable, aunque muy rara vez, mediante la inhibición de la hemaglutinación convencional [HI] (Alexander et al., 1984). Las variaciones antigénicas detectadas por los anticuerpos monoclonales y secuenciación de nucleótidos del genoma del virus han demostrado ser herramientas valiosas para comprender la epidemiología de la ENC (Alexander et al., 1987, 1997). El virus de la ENC es endémico y afecta no solo la industria aviar, sino se mantiene en criadores informales, crianza de traspatio y aves de riña (Awan *et al.*, 1994).

b. Por inmunogenicidad

En un sentido amplio, inmunogenicidad se refiere a la habilidad de una vacuna para proveer una protección significativamente mejor que la provista por otras vacunas en las mismas circunstancias. Esta evaluación puede involucrar la cantidad de anticuerpos producidos, la reducción del número de aves enfermas o muertas luego del desafío y una reducción de la excreción de virus producido post desafío (Miller y Koch, 2013). Vacunas formuladas con la misma cepa o con clones de la cepa podrían no tener la misma inmunogenicidad. Por ejemplo, se ha demostrado que clones de La Sota son menos protectoras que vacunas formuladas con cepas de campo de La Sota (Winterfield *et al.*, 1980; Winterfield y Dhillon, 1981)

c. Por genética o Molecular

El análisis filogenético del genoma es ahora el procedimiento estándar empleado por la mayoría de los laboratorios que caracterizan cepas de la ENC. Mientras que los primeros análisis se enfocaban en secuencias parciales del gen F debido a su importancia en la determinación de la virulencia, esfuerzos más recientes están comparando la secuencia completa del gen. Para la determinación molecular de la virulencia es suficiente una secuencia parcial de la proteína de fusión de 274 bases de largo que codifica el sitio donde el precursor F0 se separa en los fragmentos F1 y F2 (Miller y Koch, 2013).

d. Por patogenicidad

El primer intento para distinguir las cepas mediante una prueba de laboratorio fue por la evaluación de la virulencia. Hanson y Brandly sugirieron que los virus de la ENC podrían ser clasificadas por su virulencia, según la mortalidad en embriones de pollo inoculados con el virus, de acuerdo a este criterio, las cepas eran "velogénicas" si mataban a los embriones en menos de 60 horas post inoculación de los embriones, "mesogénicas" si mataban al embrión entre 60 y 90 horas y "lentogénicos" si mataban a los embriones después de 90 horas de la inoculación (Hanson y Brandly, 1955).

La clasificación de cepas por el tiempo de muerte del embrión se utilizó como guía para clasificar los cuadros de enfermedad de Newcastle producidos por cepas de campo.

El vENC se multiplica en las mucosas oculares y en los tractos respiratorio y digestivo. El periodo de incubación dura entre 2 a 15 días dependiendo de la cepa viral (Miller *et al.*, 2010),

las formas clínicas varían de acuerdo a la virulencia de la cepa que lo ocasiona (Alexander, 2008; Beard y Hanson, 1981), considerándose los patotipos siguientes:

- **Velogénica viscerotrópica:** forma altamente patogénica que suele presentar lesiones hemorrágicas en el intestino.
- **Velogénica neurotrópica:** forma que se presenta con alta mortalidad, que usualmente sigue a una sintomatología respiratoria y nerviosa.
- **Mesogénica:** forma de baja patogenicidad, con escasos signos respiratorios y eventualmente síntomas nerviosos, pero con baja mortalidad.
- **Lentogénica:** forma que se presenta con signos respiratorios leves, como una infección respiratoria subclínica.
- **Entérica asintomática:** forma que se presenta como infecciones entéricas subclínicas

Los síntomas clínicos originados por cepas de baja virulencia pueden intensificarse si están presentes otros agentes infecciosos o cuando las condiciones medio ambientales no son favorables (Alexander, 2003).

Durante la replicación, las partículas del virus se producen con un precursor glicoproteico inactivo, F0, el cual tiene que dividirse en F1 y F2 para que se conviertan en fracciones víricas infectivas (Rott y Klenk, 1988). Esta división post-traducciona está catalizada por proteasas de la célula hospedadora (Nagai *et al.*, 1976). La molécula FO de los vvENC, para dividirse, necesita de una proteasa que está presente en una gran cantidad de células y tejidos del huésped lo que facilita su propagación por el organismo haciendo daño a diversos e importantes órganos. En cambio, la molécula FO de los virus de baja virulencia para dividirse necesita de la tripsina que está presente en un limitado número de células del tracto respiratorio y del digestivo, limitando así su diseminación (Rott y Klenk, 1988; Rott, 1979).

Como se describió en párrafos anteriores, una gran parte de los virus virulentos de la ENC tienen la particularidad de poseer en el extremo Carboxilo-terminal de la proteína F2, la secuencia 112-R/K-R-Q-K/R-R-116 y en el extremo Nucleótido-terminal de la proteína F1 en la posición 117 un residuo de fenilalanina, a diferencia de los virus poco virulentos que presentan en la misma región la secuencia de 112-G/E-K/R-Q-G/E-R-116 y en la posición 117 un residuo de leucina (Collins *et al.*, 1993). Para que el virus sea considerado como virus virulento es indispensable la presencia de un mínimo de dos aminoácidos básicos en las posiciones 115 y 116 y un residuo de fenilalanina en la posición 117. El virus de Newcastle que afecta a las palomas (PPMV-1), es la excepción ya que presentando una secuencia en la misma región 112G-R-Q-K-R-F117 lograban un índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) alto (Collins *et al.*, 1996)

Se han diseñado ensayos biológicos para clasificar la patogenicidad de las cepas del virus teniendo en cuenta los síntomas clínicos o la mortalidad de las aves. Estas evaluaciones permiten una cuantificación del grado de severidad calculando un índice de Patogenicidad. El índice más usado es el índice de patogenicidad intracerebral en pollos de un día de edad (ICPI) seguido del índice de patogenicidad endovenoso (IVPI) en pollos de seis semanas de edad. La Organización Mundial de Salud Animal (OIE), usa el índice ICPI para la determinación de la virulencia in vivo (Alexander, 2003)

5. Impacto Económico

Las enfermedades de las aves también tienen un impacto significativo en el bienestar humano, especialmente en áreas rurales donde los pollos de traspatio son una fuente de ingresos y una fuente nutricional importante (Miller y Koch, 2013). A pesar de estos desafíos, los pollos de aldea juegan un papel vital en muchos hogares rurales pobres, proporcionando una importante fuente de nutrición de alta calidad y de ingresos para las familias que los crían. La producción avícola familiar o en pequeña escala representa una actividad productiva práctica y eficaz para aliviar la pobreza, en particular para las mujeres y los agricultores de escasos recursos (Gueye, 2000a; Gueye, 2000b). Las familias a menudo tienen pollos como fuente de dinero rápido para pagar medicinas, alimentación, transporte o los gastos de escolaridad, siendo una fuente de ingresos más conveniente que la crianza de otro tipo de animales, (Permin *et al.*, 2004). Empero, los sistemas familiares de producción de aves de corral se caracterizan por la baja productividad y enfrentan limitaciones relacionadas con enfermedades y alta mortalidad. Los países con una industria aviar industrializada destinan ingentes recursos para prevenir esta enfermedad o las pérdidas derivadas de la misma, con el fin de mantener un estatus de libre o erradicarla luego de un brote (Miller y Koch, 2013).

6. Epidemiología

Hay evidencias de la capacidad del virus de infectar a diversas especies de aves, más de doscientas, la severidad del cuadro clínico y lesiones que ocasiona la enfermedad varía ampliamente y son dependientes de factores como son la cepa de virus, huésped, protección inmune, infección con otros microorganismos y condiciones de estrés ambiental. Las cepas menos patógenas pueden inducir severas lesiones bajo condiciones ambientales adversas en donde el cuadro clínico se complica por los agentes oportunistas (Alexander, 2003).

Cuando menos 241 especies de aves son infectadas por el vENC y ello representa el 54% de las Ordenes existentes. Aparentemente todas las aves son susceptibles de infectarse con el vENC, no obstante el grado de afectación es variable de una especie a otra y está condicionada a la cepa viral (Kaleta y Baldauf, 1988)

Se considera que se han presentado cuatro o más panzootias (Abolnik *et al.*, 2004; Alexander, 2001b) desde que se reportó la enfermedad por primera vez. Brevemente, la primera panzootia o el primer brote de enfermedad reconocido que se dispersó a nivel mundial parece haber comenzado en el Sur de Asia en 1926, se movió hasta Inglaterra durante el mismo año (Miller y Koch, 2013). La primera panzootia se extendió hasta cerca de los años 60's (Cuello *et al.*, 2011). Los genotipos asociados con esta panzootia fueron los genotipos II, III y IV.

La segunda panzootia empezó al final de la década de 1960, se inició en el medio oriente y se extendió a varios países en 1973, coincidiendo con una gran cantidad de comercio internacional de productos avícolas, los virus comprometidos en esta panzootia fueron del genotipo V y estuvieron asociados con la importación de psitácidos enjaulados, que llevaron a la creación de estaciones de cuarentena y programas de control de la enfermedad (Miller y Koch, 2013).

La tercera panzootia empezó a finales de los 70'e involucró a cepas variantes del vENC encontrados en palomas denominados PPMV-1. Estos aislamientos fueron del mismo serotipo de otros aislados de APMV-1, pero tenían epítomos únicos que se podían diferenciar con anticuerpos monoclonales (Miller y Koch, 2013). Se presume que estos aislamientos PPMV-1 se originaron en el norte de África y/o en el medio este, se comenzaron a aislar en palomas y pichones a principios de los '70s y se dispersaron rápidamente al resto del mundo. La presentación neurotrópica de la ENC en pichones a partir de infecciones con PPMV-1 se hizo más prevalente. Múltiples brotes de PPMV-1 en pollos han ocurrido, pero el PPMV-1 produce un cuadro variable e impredecible (Miller y Koch, 2013). La amenaza de la infección con PPMV-1 todavía es vigente hoy en día pues estos virus están circulando a nivel mundial.

La cuarta panzootia empezó en 1980 en el sudeste asiático con el aislamiento del genotipo VII del virus, que se dispersó rápidamente a África y el oeste de Europa y finalmente a Sudamérica en el año 2008 (Miller y Koch, 2013).

La aplicación de vacunas en las aves comerciales de casi todo el mundo, dificulta el poder establecer el ámbito geográfico real en el que está presenta la enfermedad de Newcastle

Igualmente, a menudo se hace una distinción entre la avicultura comercial y la crianza informal de pollos y aves de riña en el traspatio de las casas. A pesar de la vigilancia internacional de la ENC que se lleva a cabo por organismos como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y OIE, las cifras ofrecidas para la distribución podrían no representar la verdadera distribución de los brotes (Alexander, 2008). La ENC está largamente esparcida en varios países de América, Asia y África; en Oceanía algunos países aparentemente están libres de ella. (Aldous y Alexander, 2001).

Actualmente se evidencia su presencia en Europa, Asia, África, América y Australia (Abolnik *et al.*, 2004; Nolen, 2002; Pedersen *et al.*, 2004) el impacto económico es considerable teniendo en cuenta la mortalidad que ocasiona el virus, la aplicación de medidas sanitarias para evitar la diseminación de la enfermedad y las implicancias de las limitaciones en el comercio de las aves. La distribución del vNDV depende de los intentos de erradicación por un lado y del control realizado en diferentes países. El éxito de las medidas de control, a su vez, depende de la naturaleza de la industria de las aves de corral (vale decir, los países con más crianza informal y de traspatio tienen muchos más problemas que los que tienen su parvada organizada en grandes bandadas comerciales) (Alexander, 2008).

Hay muy pocas áreas en el mundo que no han sido afectadas por la ENC. Desde Julio' 2009 hasta Diciembre' 2011, ochenta y seis países reportaron infecciones por ENC a la OIE (Alexander, 2008). La ENC es particularmente problemática para la avicultura en países del medio oriente, África y Asia. La situación se complica cuando algunos países con vNDV todavía usan vacunas con cepas Mesogénica que son definidas como virulentas debido a su sitio de separación y a su alto valor de ICPI. No hay manera de distinguir animales vacunados de infectados durante un brote de campo (Miller y Koch, 2013). La transmisión potencial desde palomas silvestres y cormoranes continúa siendo una preocupación para la industria aviar. Brotes esporádicos de la ENC en la industria aviar pueden ocurrir en países donde el vENC no es endémico y en los cuales la vacunación contra la ENC es rutinaria (Miller y Koch, 2013).

El vENC es endémico en el Perú y afecta no solo la industria aviar, sino se mantiene en criadores informales, crianza de traspatio y aves de riña. El control del vENC rebaza las capacidades de los productores comerciales. En la actualidad, el proceso de vacunación contra la ENC no está exento de riesgos y limitaciones. Muchos programas de vacunación requieren varias manipulaciones de las aves en edad de crecimiento, usualmente a los 10 y 28 días de edad (Swayne y King, 2003), sea vía ocular o por aspersión, requiriéndose de personal capacitado y equipo especializado (Kapczynski *et al.*, 2013), lo que no siempre es así. El proceso de

vacunación en granja genera un stress en los pollos que podría complicarse originando otros problemas sanitarios (Martins, 2003; Yang *et al.*, 2011) en contra de la productividad del lote a largo plazo (Awan *et al.*, 1994). La vacuna vectorizada se aplica en planta, contrarrestando el estrés de manejo y la eliminación de virus en el medio ambiente (Gallili y Ben-Nathan, 1998)

7. Transmisión

El APMV-1 puede ser transmitido por inhalación o ingestión (ruta fecal-oral). Las aves eliminan el virus en las heces y las secreciones respiratorias (Miller y Koch, 2013). Las gallináceas eliminan el APMV-1 por una o dos semanas. La eliminación prolongada se ha registrado en otras aves como búhos (más de 4 meses), cormoranes (1 mes) y psitácidas que pueden eliminar el virus por más de un año. (Alexander, 2008). Las Rutas "tradicionales" de la transmisión del virus de la ENC son contacto directo con animales, alimento contaminado, agua, equipos de granja, transporte o transmisión a través de personas comportándose como fómites (Alexander, 1995). Empero, la ruta principal de infección es la aerógena (Alexander, 2003). La transmisión exitosa por vía aerógena depende de varios factores, principalmente ambientales tales como la temperatura, la humedad y la densidad de población (Li *et al.*, 2009). La transmisión aérea del vENC podría ser reducida por el aumento artificial de la ionización negativa del aire (Estola *et al.*, 1979; Mitchell y King, 1994). Cuando las condiciones climáticas son adecuadas la infección se puede transmitir por vía aerógena. La transmisión aerógena del vENC representa una amenaza en zonas avícolas densamente pobladas, pues se ha descrito el aislamiento del virus en muestras de aire de corrales afectados con la enfermedad (Li *et al.*, 2009).

8. Signos Clínicos

La presentación clínica de la ENC varía grandemente dependiendo de factores tales como la cepa del virus, la salud, la edad y especie de hospedero. Los signos pueden ser respiratorios (jadeo, tos), nerviosos (parálisis o torticollis) o ser generales (depresión, inapetencia, hinchazón ocular o facial, diarrea, reducción de la producción de huevos y huevos con cáscara delgada o descolorida). En general, la sintomatología clínica se puede agudizar de acuerdo al patotipo viral, lo que depende de la cepa del vENC. En el caso de los vvENC se puede presentar súbitamente una alta mortalidad sin que se hubieran manifestado síntomas clínicos previos. En brotes producidos por el patotipo vvENC los signos suelen comenzar con decaimiento, incremento de la respiración y debilidad, acabando con la postración y muerte (Alexander, 2008). Durante la panzootia causada por este tipo de virus en los años 1970-1973, en algunos países como el Reino Unido e Irlanda del Norte se observaron signos respiratorios severos a

diferencia de brotes ocurridos en otros lugares en donde los signos respiratorios fueron menos severos (Alexander, 2008). Este tipo de virus al principio del brote puede propiciar un edema peri ocular y edema uni o bilateral en la cabeza y diarrea verde. Se puede observar tembor muscular, paresia o parálisis de las alas y de las patas y al final del brote tortícolis y opistótonos. En pollos totalmente susceptibles, la mortalidad alcanza con frecuencia el 100% de la parvada (Alexander, 2008).

La forma velogénica neurotrópica de la ENC se ha reportado especialmente en los Estados Unidos. La presentación de los síntomas respiratorios es inesperada y en uno o dos días después le continúan los signos neurológicos, generalmente no se observa diarrea. Usualmente se puede afectar hasta el 100% de las aves siendo la mortalidad en menor porcentaje, pese a que incluso se ha registrado 50% de mortalidad en aves adultas y 90% en pollos de menor edad. En aves en producción la postura cae dramáticamente, (Alexander, 2008).

Las infecciones de campo por cepas mesogénicas del vENC suelen causar enfermedad respiratoria. En las aves adultas puede haber un marcado descenso, de duración variable, de la producción de huevos. Es posible advertir aves con signos nerviosos pero no es lo usual. Regularmente la mortalidad no es alta, excepto si son afectados animales jóvenes o susceptibles. Empero, la presentación clínica puede ser afectada considerablemente exacerbándose por condiciones ambientales desfavorables.

Las cepas lentogénicas generalmente no causan enfermedad en adultos, muchas cepas son usadas como vacunas y causan una reacción post vacunal. Bajo condiciones ambientales desfavorables, en pollos jóvenes y aves totalmente susceptibles pueden presentarse signos respiratorios graves (Alexander, 2008).

9. Hallazgos anatomopatológicos

Similar a los signos clínicos, hay una variabilidad en las lesiones de los diferentes órganos de las aves infectadas con el vENC son dependientes de la cepa y patotipo del virus infectante, además del hospedero y de otros factores que pueden afectar la severidad de la enfermedad. No existen lesiones patognomónicas, los hallazgos patológicos están asociados con cualquier forma de la enfermedad e incluso las lesiones macroscópicas también pueden estar ausentes (Alexander, 2008).

A nivel del tracto respiratorio dependiendo del grado de protección inmune pueden no observarse cambios patológicos notorios, pero cuando se observan consisten principalmente marcada congestión o hemorragias de la mucosa de la tráquea, muchas veces además

mucosidad. Comúnmente se observa aerosaculitis, pero la infección con cepas no patogénicas puede también ocasionar aerosaculitis e incremento del grosor de los sacos aéreos con secreción catarral o purulenta generalmente consecuencia de infecciones bacterianas secundarias (Alexander, 2008). Se pueden observar alteraciones patológicas severas que incluyen hemorragia en la conjuntiva inferior, necrosis focal del bazo, y edema paratraqueal (Alexander, 2008).

10. Diagnóstico y Tratamiento

a. Identificación del agente

La capacidad hemaglutinante de fluidos cosechados a partir de huevos embrionados inoculados se puede deber a cualquiera de los Paramixovirus aviares (incluyendo al virus de la Enfermedad de Newcastle vacunal o de campo) o, cualquiera de los subtipos del virus de Influenza aviar. Se puede confirmar la presencia del virus de la ENC si la capacidad hemaglutinante es neutralizada por anticuerpos específicos contra el vENC. Existe cierto grado de reacción cruzada para la hemaglutinación entre ciertos serotipos de Paramixovirus aviares, se ha observado reacciones cruzadas, particularmente APMV-3 de psitácidos y aves exóticas (Alexander, 2008).

Los virus de la ENC se aíslan perfectamente bien en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad. La muestra biológica puede consistir en órganos tales como tráquea, pulmones, cerebro, etc. o hisopados cloacales (o heces) obtenidos de aves vivas. La muestra es triturada y homogenizada para obtener una suspensión la cual se filtra para ser inoculada en la cavidad alantoidea de los embriones. Los huevos son incubados a 37 ° C durante 4-7 días. La actividad hemaglutinante del fluido alantoideo de los embriones muertos, moribundos y los sobrevivientes sacrificados es evaluada frente a una solución de glóbulos rojos al 0.7%. La presencia del virus de la ENC en los fluidos positivos es confirmada inhibiendo la hemoaglutinación en una prueba usando un antisuero mono específico contra el vENC (APMV-1) (Spackman y Stephens, 2016).

El diagnóstico definitivo de las cepas aisladas y su virulencia es obligatorio, porque la ENC es de notificación obligatoria y está sujeta al control de la autoridad sanitaria oficial en un importante número de países, pues con el vENC hay el peligro de diseminación desde el laboratorio (Alexander, 2008). La prueba in vivo adoptada por la agencia internacional OIE para definir la virulencia y diferenciar la patogenicidad entre las cepas de alta y baja virulencia es el índice de patogenicidad intracerebral (Brandon y Alexander, 2016). Varios métodos de RT-PCR

han sido descritos y permiten confirmar directamente la presencia o ausencia de múltiples aminoácidos básicos en el punto de corte de la proteína F, diferenciando a los virus patógenos de los no patógenos (Brandon y Alexander, 2016).

b. Supervivencia del virus de la ENC

Fundamentalmente las secreciones y excremento generadas por las aves infectadas con el vENC son la principal causa de propagación de los virus y contaminación de las aves en forma directa, aves afectadas en contacto con aves enfermas, o en forma indirecta por intermedio de fómites como equipamiento, neumáticos de vehículos, indumentaria, calzado y otros. La viabilidad del virus en el medio ambiente es fundamental para la diseminación y persistencia de la ENC. (Lancaster, 1966). Se estima que la supervivencia del vENC es extremadamente variable y está supeditada a múltiples factores ambientales por lo que no se puede tener cifras de tiempo de supervivencia exactas del virus en diversos substratos, además que los estudios sobre estabilidad del virus en el ambiente datan de mucho tiempo atrás y no incluyen todas las variaciones medioambientales en las que podría sobrevivir o no el virus. Esta data permitiría conocer mejor la dinámica de difusión del virus y nos orientaría a diseñar planes de control mejor ambientados al lugar para el cual se está desarrollando las políticas. Las fuentes de contaminación principal son indirectas por fómites, diversos estudios han evaluado la viabilidad del virus en diferentes materiales. Debido a la importancia de las heces en la transmisión de la ENC y a la supervivencia del virus en ellas, se han realizado algunos estudios para corroborar su sobrevivencia en ellas. Corroborando lo anteriormente mencionado, la supervivencia del virus es extremadamente variable, en el Cuadro 2 se describe la data disponible sobre la viabilidad del virus en las heces expuestas a diversas temperaturas (citado por Sanchez-Vizcaino, 2011)

Cuadro 2. Tiempo de supervivencia del vENC en diferentes tipos de heces en función a la temperatura.

Material	Temperatura ambiental	Días de supervivencia
Heces estériles	36,6°C	< 4 días
Heces	37°C	56 días
Heces	20-30°C	94 días
Heces	-11-36°C	172 días
Heces	3-6°C	538 días
Heces	-26°C	538 días
Estiércol	23-29°C	<14 días
Estiércol	8,8-26,6°C	16 días

Frente a la probabilidad que las aguas de ríos o lagos puedan tener un rol importante en el mantenimiento del vENC y que al ser contaminados contribuyan a la diseminación de la enfermedad, se han reconocido dos trabajos de investigación sobre la viabilidad del vENC en el agua. Las conclusiones alcanzadas en los dos estudios realizados no proporcionan un conocimiento completo quedando pendiente incluir otros factores como el pH o los diversos valores de salinidad del agua según su origen. (Sanchez-Vizcaino, 2011). El Cuadro 3 muestra el tiempo de supervivencia del vENC en el agua a diversas temperaturas

Cuadro 3. Tiempo de supervivencia del virus de la ENC en el agua a diferentes temperaturas

Tipo de agua	Temperatura del agua	Días de supervivencia
Suspensión acuosa	1,1-1,7°C	< 217 días
Suspensión acuosa	0°C	< 175 días
Agua de lago	No registrada	11-19 días

Para determinar la relevancia que tienen las aves muertas en la propagación de la ENC, es imprescindible conocer la viabilidad del virus en las carcasas de estas aves. A pesar de que su sobrevivencia está supeditada a múltiples causas, se ha evidenciado que es altamente resistente a bajas temperaturas; se ha demostrado que el virus puede permanecer viable en piel y médula ósea de aves muertas exentas de plumas y eviscerada por 14 y 19.1 semanas a temperaturas de 1,1 y 1,7 respectivamente. En aves muertas no desplumadas, manteniendo las mismas temperaturas, la viabilidad del virus se incrementó a 22.8 y 28 semanas respectivamente. Posteriormente se repitió la prueba exponiendo al virus a una temperatura de - 15°C, lo que se tradujo en un mayor tiempo de supervivencia, llegando a más de 42.8 semanas en aves muertas

con o sin plumas. En numerosos estudios se evaluó la viabilidad del virus en el suelo de granjas que habían alojado aves infectadas, obteniendo resultados diversos. Se considera el suelo como un posible medio de propagación del virus actuando este como un vector mecánico en las infecciones de aves susceptibles. (Citado por Sanchez-Vizcaino, 2011) En un estudio fueron registrados los diferentes periodos de supervivencia del vENC en el suelo a diferentes temperaturas y humedad relativa (Cuadro 4). Posteriormente en un segundo estudio se detectó que la viabilidad del virus estaba afecta a las condiciones climáticas y dependía de la estación del año, siendo la estación de mayor temperatura la que ponía en riesgo su viabilidad, en verano el virus no sobrevivía más de una semana, en primavera no más de dos semanas y en invierno no más de 30 días (Lancaster, 1966). En un subsiguiente ensayo, las granjas contaminadas con el vENC dejaron de serlo pasados 6 a 14 días, sin embargo el virus podía permanecer viable en las camas de éstas granjas hasta 53 (Lancaster, 1966)

Cuadro 4. Tiempo de supervivencia del vENC en el suelo en función de la humedad relativa y la temperatura

Medio	Temperatura	Humedad Relativa	Supervivencia
Suelo estéril	20°C	100%	22 días
Suelo	20°C	100%	22 días
Suelo estéril	20°C	0%	8 días
Suelo	20°C	0%	8 días
Suelo estéril	20°C	15%	15 días
Suelo	20°C	15%	15 días
Suelo	37°C	No registrada	25 días
Suelo	20-30°C	No registrada	71 días
Suelo	-11-36°C	No registrada	172 días
Suelo	3-6°C	No registrada	235 días

11. Vacunación

Complementariamente a las medidas de bioseguridad, la vacunación de las parvadas es sumamente importante para el control de la ENC y la eliminación de lotes infectados o en riesgo de infección (zona de protección) (Bermudez y Stewart-Brown, 2003). Las vacunas y las estrategias de vacunación empleadas en la actualidad protegen contra la morbilidad y la mortalidad y reducen significativamente la sintomatología (Van *et al.*, 2008), empero no detienen la infección ni la excreción viral, que son críticas para controlar la propagación del virus causante de la enfermedad (Kapczynski y King, 2005a).

En otros animales la vacunación contra algunos tipos de virus, lleva a un estado inmune por un período de tiempo considerable, incluso toda la vida del animal, induciendo una inmunidad sólida que se puede adquirir incluso con una sola dosis de vacuna. No es el caso de la ENC (Kapczynski *et al.*, 2013). Los intentos en controlar y erradicar la enfermedad mediante la vacunación no han sido los esperados porque mientras que la vacunación previene de los signos clínicos y de la mortalidad no se previene la replicación del virus (Alexander, 2001a).

Antes de la existencia de las vacunas vectorizadas, la prevención de la enfermedad se realizaba con vacunas con virus vivo completo (Cuadro 5) y vacunas con virus inactivado (Gallili y Ben-Nathan, 1998). Las vacunas con virus vivo son cepas de baja patogenicidad cuya infección desencadena una respuesta similar a un virus patogénico sin producir mayores síntomas clínicos. Las vacunas vivas requieren múltiples aplicaciones para asegurar una respuesta inmune que induzca una protección duradera para toda la vida del ave. El cuadro 5 presenta los ocho virus más comunes usados en vacunas vivas (Gallili y Ben-Nathan, 1998).

Las vacunas con virus muerto contienen las cepas más reactivas, pero que han sido inactivadas con agentes químicos, radiación o calor. Estas vacunas sólo producen una respuesta humoral (Gallili y Ben-Nathan, 1998).

5. Ocho cepas usadas en las vacunas contra la enfermedad de Newcastle con virus vivo

Cepa	Descripción
F	Lentogénica: Usualmente se usa en pollos jóvenes, pero capaz de inducir inmunidad en todas las edades
B1	Lentogénica: Ligeramente más virulenta que F, usada para vacunar aves de todas las edades
La Sota	Lentogénica: Usualmente produce signos clínicos post-vacunales. usado como refuerzo (booster) de parvadas vacunadas con F o B1
V4	Avirulenta, usada en aves de todas las edades
V4-HR	Avirulenta. V4 resistente al calor, termoestable, usada en aves de todas las edades
I-2	Avirulenta, termoestable, usada en todas las edades
Mukteswar	Mesogénica, Es una cepa invasiva, usada para reforzar vacunaciones previas. Puede causar reacciones adversas (signos respiratorios pérdida de peso, baja en postura y eventualmente muerte si se usa en aves parcialmente inmunes)
Komarov	Menos patogénica que Mukteswar, usada como refuerzo

Las políticas de control del vENC a nivel de país se relacionan con el número de brotes reportados, tal como lo describe el Cuadro 6 (Gallili y Ben-Nathan, 1998).

Cuadro 6. Número de brotes y política nacional de control del vENC en el período 1990-1997

País	Número de Brotes	Política Nacional de control
Alemania	255	Obligatoria para granjas con más de 200 aves hasta 1994, todas las aves desde entonces
Holanda	77	Obligatoria
Portugal	56	Obligatoria desde 1991
Bélgica	88	Voluntaria primero, compulsoria desde 1992
Luxemburgo	10	Voluntaria primero, obligatoria desde 1992
Francia	13	Voluntaria
Italia	58	Voluntaria
España	2	Voluntaria
Reino Unido	46	Voluntaria
Austria	6	Voluntaria
Irlanda	6	Prohibida desde 1997
Dinamarca	18	Prohibida
Suecia	2	Prohibida
Finlandia	2	Prohibida
Noruega	1	Prohibida

Las vacunas contra el vENC son ampliamente utilizadas en la avicultura comercial para proteger a las aves contra la enfermedad y reducir la propagación del virus pero no pueden impedir que las aves vacunadas eliminen el virus (Westbury *et al.*, 1984b), y lo transmitan a aves susceptibles (Senne *et al.*, 2004; Kapczynski y King, 2005b; Kapczynski *et al.*, 2012). Una ventaja adicional se tendría en inducir una buena inmunidad persistente a pesar de la presencia de anticuerpos maternos después de una sola vacunación en pollos de 1 día de edad (Westbury *et al.*, 1984a).

a. Vacunas contra vENC vectorizadas

Durante los últimos diez años las vacunas vectorizadas han sido incorporadas a la lista de vacunas contra la ENC porque han mostrado tener muchas ventajas sobre las vacunas convencionales. El genoma de los herpesvirus puede ser modificado genéticamente integrando genes ajenos al virus usando procesos de recombinación homólogos a los descritos en los Pox virus (Cremer *et al.*, 1985; Mackett *et al.*, 1985; Moss, 1991). En la década del 90, fueron desarrolladas las primeras vacunas vectorizadas contra la ENC, las cepas del herpesvirus del pavo (HVT), avirulentas, del grupo de virus de la Enfermedad de Marek serotipo 3, fueron seleccionadas como vector para desarrollar una vacuna vectorizada de péptidos protectivos contra la enfermedad de Newcastle (Sondermeijer *et al.*, 1993).

De acuerdo a varias observaciones hechas en herpesvirus, hay secuencias del genoma viral que pueden mutar o borrarse sin debilitar las funciones necesarias para la replicación viral (Post y Roizman., 1981; Shih *et al.*, 1984; Lowe *et al.*, 1987; Thomsen *et al.*, 1987)

Los primeros estudios usando al herpesvirus de pavo (HVT) como vector, pero con la finalidad de seleccionar el y los insertos más apropiados del virus de la ENC, glicoproteína F o HN, determinaron que los pollos que recibieron una sola inoculación intra abdominal con la cepa recombinante del virus herpes de pavo que expresaba el gene de la proteína de fusión, tuvieron una respuesta inmunológica y fueron protegidos contra el desafío con la cepa Texas GB del vENC administrado intramuscularmente a los 28 días de edad. Contrariamente la cepa recombinante del virus herpes de pavo que expresaba el gene de la hemoaglutinina-neuraminidasa dio solo una protección parcial (47%) contra el mismo desafío (Morgan *et al.*, 1992). Actualmente, todas las vacunas vectorizadas contra la ENC contienen el gen F.

Una de las principales ventajas del vector HVT, es la persistencia del virus en el ave a largo plazo, al igual como ocurre con el virus rHVT en pollos inoculados con la vacuna vectorizada en Marek (Burmester *et al.*, 1971; Okazaki *et al.*, 1971, 1973; Purchase *et al.*, 1972), la expresión del gen F fue medible incluso después de 30 semanas de la inoculación subcutánea de pollos de 1 día de edad. Otra característica favorable de las vacunas vectorizadas es la no interferencia con los anticuerpos maternos. Más allá de eso, la aplicación in ovo de éste tipo de vacuna en pollos libres de patógenos específicos (SPF) demostró ser segura ya que no presentó efectos adversos sobre la eclosión o la supervivencia del pollito después de la eclosión (Purchase *et al.*, 1972).

Se ha señalado que las nuevas vacunas vectorizadas contra la ENC no sólo protegen a las aves contra la enfermedad, sino también reducen la cantidad de virus eliminado por las aves vacunadas a un nivel que disminuyen considerablemente la transmisión horizontal del virus de un ave a otra (Palya *et al.*, 2012, 2014).

V. MATERIAL Y METODOS

1. Lugar de estudio y periodo de ejecución:

El ensayo se llevó a cabo en los módulos bioseguros experimentales con que cuenta el laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, localizada en el distrito de San Borja, provincia de Lima. El trabajo práctico se realizó de marzo a abril del 2012.

2. Descripción del material experimental:

a. Tamaño muestral

El tamaño muestral mínimo requerido para el presente estudio, se estimó mediante el paquete comercial Pass 14, considerando una diferencia esperada de 29.7% en el porcentaje de mortalidad entre las aves del grupo experimental III (vacuna vectorizada en virus Marek, 0.3%) y las aves del grupo experimental IV (control sin vacuna de Newcastle, 30%), con una potencia estadística de 90% y un nivel de significancia de 5%, a partir del cual se obtuvo un mínimo de 30 aves por grupo experimental. No obstante, el número de aves por tratamiento fue incrementado a 50 aves ($n = 200$) de 1 día de edad, debido a consideraciones logísticas y para alcanzar parámetros medio ambientales como temperatura a través de la densidad. Este tamaño muestras nos permitió además evaluar y comparar los efectos adversos y signos clínicos entre los tratamientos experimentales.

b. Diseño experimental

El presente estudio corresponde a un Ensayo Clínico (Meinert y Tonascia, 1986), que evaluó la eficacia de tres programas de vacunación contra virus de Newcastle, para lo cual se distribuyeron pollitos recién nacidos en 4 grupos tratamientos experimentales mediante un diseño completamente al azar (ver descripción de los tratamientos experimentales en el Cuadro 7), luego del cual las aves fueron expuestas a un desafío experimental con una cepa patógena de Newcastle de campo. Los animales muertos, a consecuencia del desafío, se trabajaron buscando lesiones (Marangon y Busani, 2007).

Cuadro 7. Programa de vacunas empleadas en el experimento

Tratamiento experimental	1er día – Planta de Incubación					9no día Crianza
	Newcastle	Newcastle	Bronquitis	Marek	Gumboro	Newcastle
I	Inactivada	Viva Avinew	Mass H120	½ Dosis	Bursaplex	Viva Avinew
II	–	Viva Avinew	Mass H120	½ Dosis	Bursaplex	Viva Avinew
III	Vectorizada HVT/ENC	Viva Vitapest	Mass H120	Dosis completa	Bursaplex	–
IV	Control sin vacuna	Control sin vacuna	Mass H120	½ Dosis	Bursaplex	–

c. Alimentación

Se suministró, ad libitum, un alimento de tipo comercial acorde con los requerimientos nutricionales usuales en este tipo de aves.

d. Vacunas evaluadas

Vacunas contra la Enfermedad de Newcastle: Vacuna vectorizada (HVT / ENC), vacunas a virus vivos e inactivada.

e. Desafío viral:

El 100 % de las aves fueron desafiadas a los 26 días edad, aplicando vía ocular 60 µL de un inóculo preparado con una cepa velogénica Genotipo XII, IPIC 1.82, aislada de un pavo real, con un título de $10^{7.8}$ DIE 50

f. Equipos de crianza:

Se utilizaron comederos tipo tolva, bebederos tipo “tonguito”, focos incandescentes, calefacción a gas, mallas divisoras, arpilleras, cercos de Nordex, termómetros de máxima y mínima, una balanza electrónica con exactitud de 5 gramos, guantes, cámara digital, etc.

3. Parámetros evaluados:

a. Reacciones post vacunales 1 a 21 días de edad

Se evaluaron las reacciones post vacunales, diariamente y en el 100% de las aves, desde el día 1 hasta los 21 días de edad; anotándose los signos clínicos: estornudos y ronquera (Gallili y Ben-Nathan, 1998)

La presencia o ausencia de reacciones post-vacunales se evaluaron como variable binaria (presencia/ausencia) y se calificaron de acuerdo al Cuadro 8. Adicionalmente, los estornudos y ronquera se evaluaron según el promedio del grado de severidad evaluada con la escala mostrada en el Cuadro 9.

Cuadro 8. Porcentaje de estornudos y ronquera hasta los 21 días de edad

Grado de estornudo y ronquera	Porcentaje de aves (%)
0	0
1	1 a 25
2	26 a 50
3	51 a 75
4	76 a 100

Cuadro 9. Evaluación de severidad de estornudos y ronquera hasta los 21 días de edad

Grado	Signos clínicos
0	Normal
1	Reacción ligera
2	Reacción moderada
3	Reacción severa

b. Mortalidad y signos clínicos post desafío

Durante los 21 días posteriores al desafío, diariamente se evaluaron los signos clínicos, la mortalidad y lesiones de las aves retadas. Dentro de los signos clínicos se tuvo en consideración cuadros respiratorios, de diarrea, de depresión y nerviosos (Office International des Epizooties,

2004). Los signos clínicos fueron definidos como presencia/ausencia y descritos durante los días 4, 6 y 12 post-desafío,

Para la recuperación viral, se tomaron muestras de tráquea, pulmón y tonsilas cecales de las aves muertas entre los días 4 y 7 post desafío para recuperación viral, por aislamiento en huevos embrionados de pollos de 9 días de incubación.

c. Respuesta serológica

Se tomaron 15 muestras de sangre por grupo experimental, a los 26 y 42 días de edad (antes del desafío y 16 días posterior a este) para valorar el nivel de los anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle por las pruebas de ELISA Idexx.

ELISA es una prueba inmunoenzimática ligada a enzimas para la detección y cuantificación de los niveles de anticuerpos frente al vENC. Se precisa de un espectrofotómetro para valorar las absorbancias de cada muestra de suero, empleando una variedad de filtros para leer la densidad óptica (DO) de cada reacción y Kits de ELISA comercial para la captación de anticuerpos del virus de la Enfermedad de Newcastle. El lector de ELISA convierte las DO en valores, expresados en unidades y reunidos por grupos para simplificar la visibilidad de los resultados.

4. Análisis de datos

Toda la información referente a reacciones post-vacunales, mortalidad, signos clínicos y lesiones post-desafío viral, así como títulos de anticuerpos medidos en ELISA según tratamientos experimentales fueron organizados en una hoja de cálculo de Excel. Con respecto a las reacciones post-vacunales, se presentaron los porcentajes de ronqueras y estornudos, así como los promedios del grado de severidad de reacciones post-vacunales (según lo descrito en el Cuadro 8 y 9 respectivamente) hasta el día 21 de edad fueron comparados entre grupos experimentales mediante análisis de Kruskal-Wallis. Se reportó el número de aves muertas según tratamientos experimentales durante los días post-desafío en una tabla resumen. Los porcentajes de mortalidad acumulada (número total de aves muertas/total de aves al inicio del desafío) fueron comparadas entre los tratamientos 1, 2 y 3 utilizando ecuaciones de regresión logística para el cálculo de odds ratios (OR) con sus respectivos intervalos de confianza (IC) de 95%. La presencia/ausencia de signos clínicos fue reportada según tratamientos experimentales durante los días 4, 6 y 12 post-desafío y comparados mediante análisis de Fisher Exacta. Los

títulos de anticuerpos medidos en el ELISA fueron reportados mediante promedio aritmético, promedio geométrico, coeficiente de variación y valores mínimo y máximo según tratamientos experimentales. Además, se describieron los hallazgos de lesiones en órganos durante la necropsia. Todos los análisis fueron realizados en el programa estadístico Rstudio versión 1.0.143, considerando un nivel de significancia de 5%.

5. Consideraciones éticas

Los procedimientos utilizados en la presente tesis se realizaron acorde con las normas éticas señaladas por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

VI. RESULTADOS

1. Reacciones post vacunales

En el Cuadro 10 se muestra, en porcentajes, las aves que expresaron una reacción post vacunal de 1 a 21 días de edad. Se pudo observar en las aves de T1, T2 y T3 la presencia de reacciones post-vacunales a partir del día 5 del estudio, siendo los porcentajes no estadísticamente diferentes entre los tratamientos T1, T2 y T3 (p -valor = 0.438). No se percibió reacción post vacunal en el T4 (grupo control no vacunado)

Cuadro 10. Porcentaje diario de aves con reacción post vacunal de estornudos y ronquera evaluados desde el día 1 hasta los 21 días de edad

Días	Grupos experimentales			
	I	II	III	IV
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	5	5	5	0
6	15	15	5	0
7	25	20	15	0
8	35	30	25	0
9	60	65	30	0
10	35	25	55	0
11	25	15	50	0
12	15	5	40	0
13	5	5	30	0
14	5	5	30	0
15	5	0	20	0
16	5	0	10	0
17	0	0	5	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0

Con respecto a los promedios del grado de severidad de reacciones post-vacunales (Cuadro 11), estos se apreciaron desde el día 5 y fueron más altos durante los días 7, 8 y 9 en los tratamientos T1 y T2, y T3. El análisis no demostró diferencias significativas entre los promedios de severidad post-vacunales entre los tratamientos T1, T2 y T3 (p -valor = 0.523), mientras que en las aves de T4 no se observaron reacciones.

Cuadro 11. Grados promedios de severidad de reacción post vacunal de estornudos y ronquera desde el día 1 hasta los 21 días de edad

Días	Grupos experimentales			
	I	II	III	IV
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0.3	0.3	0.4	0
6	0.6	0.6	0.8	0
7	1.1	0.8	1.2	0
8	1.4	1.4	1.5	0
9	1.6	1.7	1.5	0
10	1.3	0.9	1.2	0
11	0.8	0.6	1.2	0
12	0.7	0.5	1.2	0
13	0.4	0.3	0.8	0
14	0.2	0.1	0.6	0
15	0.2	0	0.3	0
16	0.2	0	0.3	0
17	0	0	0.2	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0

2. Signos clínicos y mortalidad post desafío

Previo al desafío viral se presentó mortalidad en 2 aves del tratamiento T1 y 1 ave del tratamiento T2. Posterior al desafío, los cuatro grupos de aves presentaron signos clínicos, estos aparecieron simultáneamente en todos los grupos experimentales a partir de las 48 horas y se caracterizaron por cuadros de depresión, diarrea, edema facial y posteriormente estornudos, ronquera y disnea respiratoria; observándose el pico de infección a partir del día 4 a 6 post desafío (Cuadro 12),

Cuadro 12. Tiempo de presentación de mortalidad y signos clínicos

Signos Clínicos	Grupos experimentales – n° de días			
	I	II	III	IV
Inicio de signos clínicos	2	2	2	2
Pico de infección	6	6	5	4
Signos nerviosos	8	8	9	4
Signos respiratorios	2	2	2	2
Inicio de mortalidad	5	5	12	4
Inicio de recuperación	10	10	9	ND

ND: no determinado

Los porcentajes totales de signos clínicos y mortalidad post desafío por tratamiento T1, T2, T3 y control se detallan en el Cuadro 13

Cuadro 13. Porcentajes de mortalidad total y signos clínicos hasta los 45 días de edad

Signos clínicos	Grupos experimentales			
	I	II	III	IV
Mortalidad	12.5	18.4	2.0	100
Depresión	14.6	20.4	6.1	100
Diarreas	45.8	53.3	16.3	85.7
Edema facial	8.3	12.2	6.1	95.9
Secreciones	12.5	8.2	24.5	77.6
Ronquera	66.7	61.2	44.9	67.3
Secuelas nerviosas	8.3	10.2	6.2	12.2

Los porcentajes de mortalidad durante los días 4 a 12 post-desafío son presentados en el Cuadro 14. Como se puede apreciar, la mortalidad en las aves de T1 y T2 inició al día 5 hasta el día 8 post-desafío, mientras que en el tratamiento T3 únicamente se presentó mortalidad en un ave al día 12 post-desafío. Todas las aves del tratamiento T4 (control no vacunado) murieron post-desafío (100%), mientras que los porcentajes de mortalidad en los tratamientos T1, T2 y

T3 fueron 12.5% (6/48), 18.4% (9/49) y 2.0% (1/50); el análisis de regresión logística entre los tratamientos T1, T2 y T3 (ver Cuadro 14) demostró un efecto protector similar en las aves de T3 y las aves de T1 (referencial) siendo estadísticamente no diferentes (OR: 0.14 [IC 95%: 0.02-1.23]; p -valor = 0.077) y un efecto protector significativo al comparar a las aves de T3 versus T2 (OR: 0.09 [IC 95%: 0.01-0.75], p -valor = 0.030). Los porcentajes de mortalidad entre las aves de T1 y T2 fueron estadísticamente no diferentes (p -valor = 0.427).

Cuadro 14. Número de aves muertas post desafío viral y porcentajes totales de mortalidad según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1	T2	T3	T4
4	0	0	0	4
5	1	2	0	12
6	2	4	0	21
7	2	2	0	11
8	1	1	0	1
9	0	0	0	1
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	1	0
Muertos/Total	6/48	9/49	1/50	50/50
% Mortalidad acumulada	12.5	18.4	2.0	100.0

Cuadro 15. Modelo de regresión logística para la evaluación del odds ratio (OR) de mortalidad en aves post-desafío según tratamientos experimentales^{a,b}

	OR	IC 95%	p valor
Tratamiento			
T1 (ref.)			
T2	1.58	0.51-4.83	0.427
T3	0.14	0.02-1.23	0.077

Abreviaturas:

OR (odds ratio), IC (intervalo de confianza), T1 (vacuna viva + inactivada), T2 (vacuna inactivada), T3 (vacuna vectorizada)

^aEl análisis no incluyó a las aves de T4 (control no vacunado) debido a que se observó 100% de mortalidad

^bOR de mortalidad entre las aves de T3 y T2 (ref.): 0.09 (IC 95%: 0.01-0.75; p -valor = 0.03).

En las aves muertas del tratamiento T4 (control no vacunado), al quinto día post desafío, se recuperó el virus patógeno de Newcastle por aislamiento en embriones de pollo de 9 días de incubación.

Con respecto a los signos clínicos post-desafío, los porcentajes de depresión se evidenciaron principalmente en las aves de T2 al día 4 y 6 post-desafío (16.3% y 14.89% respectivamente), siendo los porcentajes de depresión entre tratamientos estadísticamente diferentes al día 4 post-desafío (p -valor = 0.003) estadísticamente marginal al día 6 post-desafío (p -valor = 0.054). Al día 12 post-desafío no se observó depresión en las aves (ver Cuadro 16).

Cuadro 16. Porcentajes de depresión post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		p valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	0/48	0.00	8/49	16.33	2/50	4.00	0.003
6	3/47	6.38	7/47	14.89	1/50	2.00	0.054
12	0/42	0.00	0/40	0.00	0/49	0.00	1.000

Los porcentajes de diarrea al día 4 y 6 post-desafío fueron mayores en las aves de T2 (14.29% y 44.68%) y menores en las aves de T3 (2.0% y 8.0%), obteniéndose diferencias marginales entre tratamientos al día 4 post-desafío (p -valor = 0.061) y estadísticamente significativas al día 6 post-desafío (p -valor <0.001). No se presentó diarrea al día 12 post-desafío (ver Cuadro 17).

Cuadro 17. Porcentajes de diarrea post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		p valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	3/48	6.25	7/49	14.29	1/50	2.00	0.061
6	5/47	10.64	21/47	44.68	4/50	8.00	<0.001
12	0/42	0.00	0/40	0.00	0/49	0.00	1.000

Los porcentajes de edema facial fueron estadísticamente no diferentes entre las aves de los tratamientos experimentales durante los días 4 y 6 post-desafío (p -valor = 0.104 y p -valor = 0.190 respectivamente) y no se observó edema facial al día 12 post-desafío (ver Cuadro 18).

Cuadro 18. Porcentajes de edema facial post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		<i>p</i> valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	2/48	4.17	4/49	8.16	0/50	0.00	0.104
6	3/47	6.38	3/47	6.38	0/50	0.00	0.190
12	0/42	0.00	0/40	0.00	0/49	0.00	1.000

Los porcentajes de secreción fueron mayores en las aves de T3 durante los días 4 y 6 post-desafío viral (14.0% y 20.0% respectivamente), aunque el análisis no demostró diferencia significativa entre los tres tratamientos al día 4 post-desafío (p -valor = 0.655) pero sí demostró diferencia significativa al día 6 post-desafío (p -valor = 0.031). No se presentó secreción en las aves al día 12 post-desafío (ver Cuadro 19).

Cuadro 19. Porcentajes de secreción post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		<i>p</i> valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	4/48	8.33	4/49	8.16	7/50	14.00	0.655
6	3/47	6.38	2/47	4.26	10/50	20.00	0.031
12	0/42	0.00	0/40	0.00	0/49	0.00	1.000

Los porcentajes de ronquera fueron mayores en las aves de T3 al día 4 post-desafío (30.0%) y mayores en las aves de T1 y T2 al día 6 post-desafío (61.7% y 57.5% respectivamente). El análisis demostró diferencias significativas entre los tratamientos al día 4 y 6 post-desafío (p -valor = 0.002 y p -valor = 0.001 respectivamente) (ver Cuadro 20).

Cuadro 20. Porcentajes de ronquera post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		<i>p</i> valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	3/48	6.25	4/49	8.16	15/50	30.00	0.002
6	29/47	61.70	27/47	57.45	14/50	28.00	0.001
12	0/42	0.00	0/40	0.00	0/49	0.00	1.000

No se observaron secuelas nerviosas en las aves durante los días 4 y 6 post-desafío, mientras que al día 12 post-desafío se presentó en las aves de T1 (7.14%), T2 (5.0%) y T3 (6.12%), aunque no fueron estadísticamente diferentes (ver Cuadro 21).

Cuadro 21. Porcentajes de secuelas nerviosas post-desafío viral en aves según tratamientos experimentales

Días post-desafío	T1		T2		T3		p valor
	n/N	%	n/N	%	n/N	%	
4	0/48	0.00	0/49	0.00	0/50	0.00	1.000
6	0/47	0.00	0/47	0.00	0/50	0.00	1.000
12	3/42	7.14	2/40	5.00	3/49	6.12	1.000

3. Lesiones post desafío

Con respecto a las lesiones en los tejidos, en el grupo experimental T4 a los 4 y 5 días post desafío, se observaron hemorragias difusas y/o severas en el proventrículo, molleja, intestinos, y tonsilas cecales; además de esplenomegalia y congestión de bazo. (Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). En el grupo experimental T1 a los 5 días post desafío, se observaron hemorragias leves a severas en el proventrículo, agregados linfoides de intestino, serosa y tonsilas cecales; además de esplenomegalia y congestión de bazo, una de las aves muertas de este grupo no presentó hemorragias en proventrículo (Figuras 9, 10, 11 y 12). En el grupo experimental T2 a los 5 días post desafío, se observaron hemorragias en tonsilas cecales; no se observaron hemorragias en proventrículo e intestino. (Figuras 13, 14 y 15).



Figura 1. Severa hemorragia difusa en proventrículo en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post-desafío viral

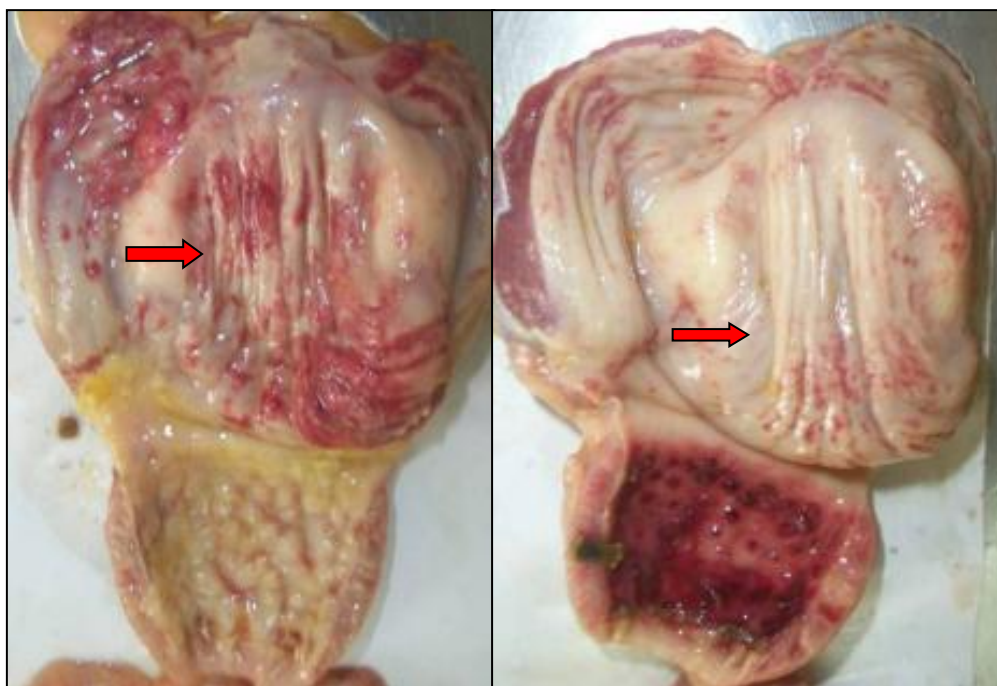


Figura 2. Hemorragia difusa en la molleja de un ave del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post-desafío viral

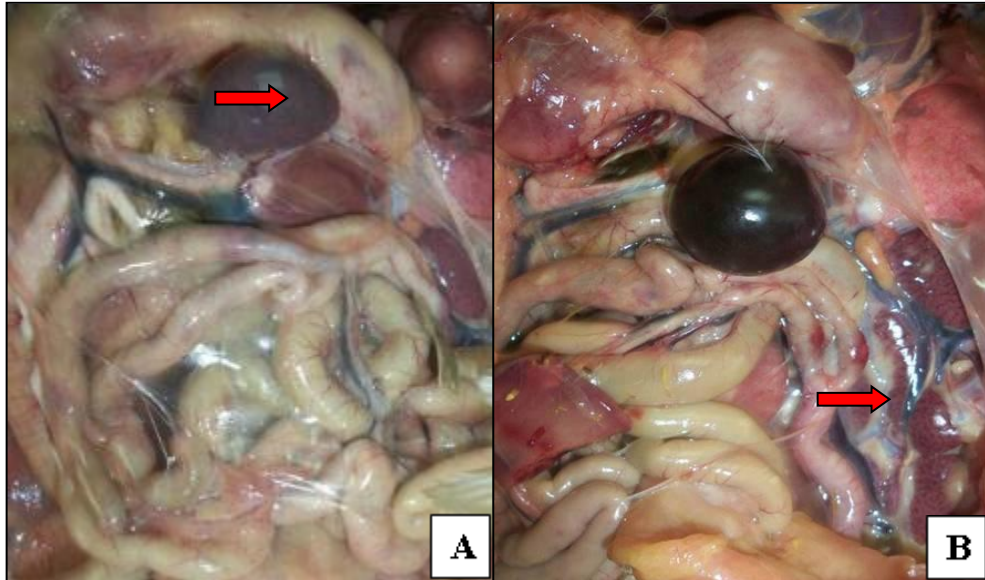


Figura 3. Esplenomegalia y congestión del bazo (A). Hemorragia en serosa de intestinos y tonsilas cecales en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post-desafío viral.

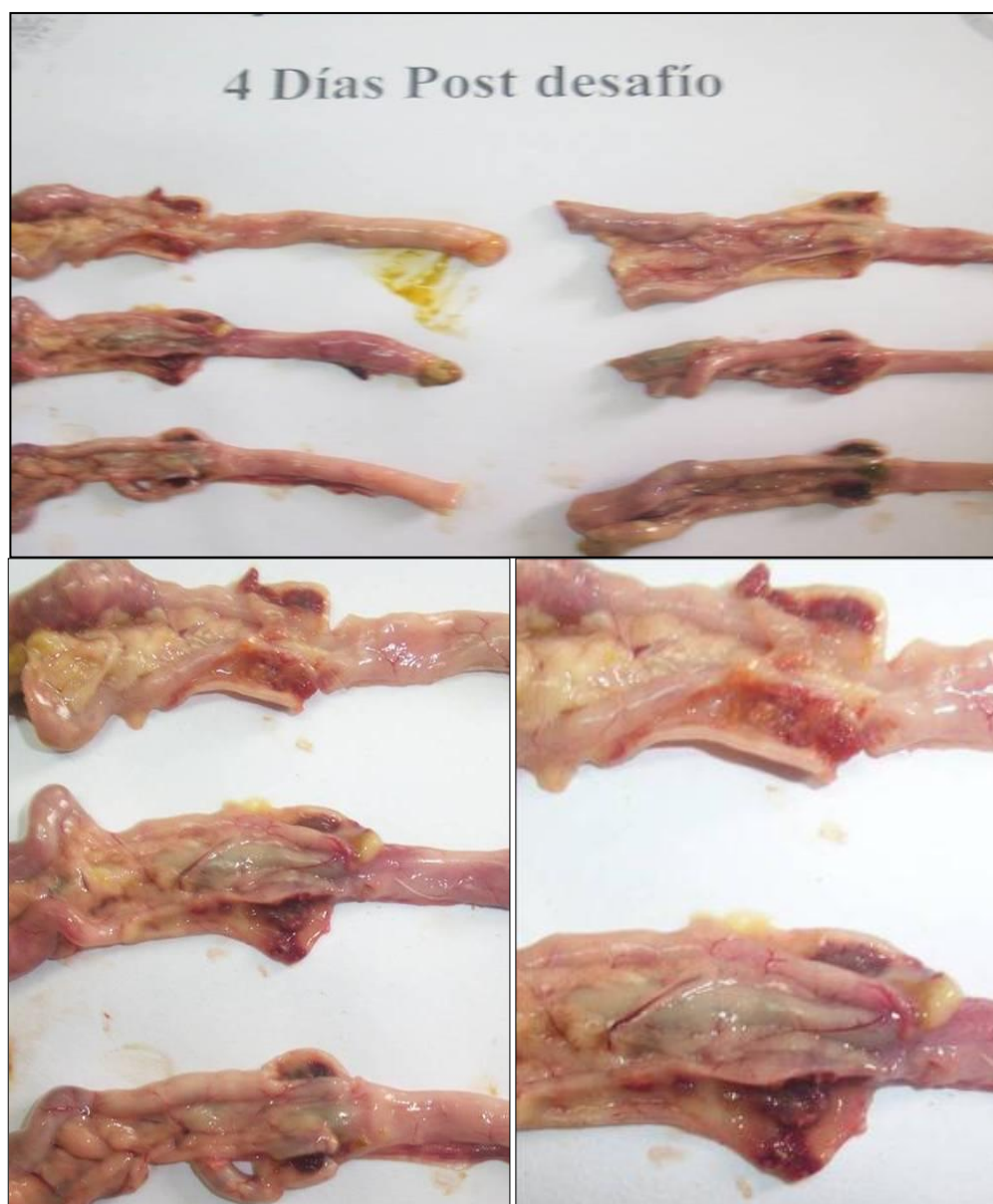


Figura 4. Severa hemorragia en tonsilas cecales de aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 4 post-desafío viral



Figura 5. Leve (A) y severa (B) hemorragia difusa en proventrículo de aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post-desafío viral.

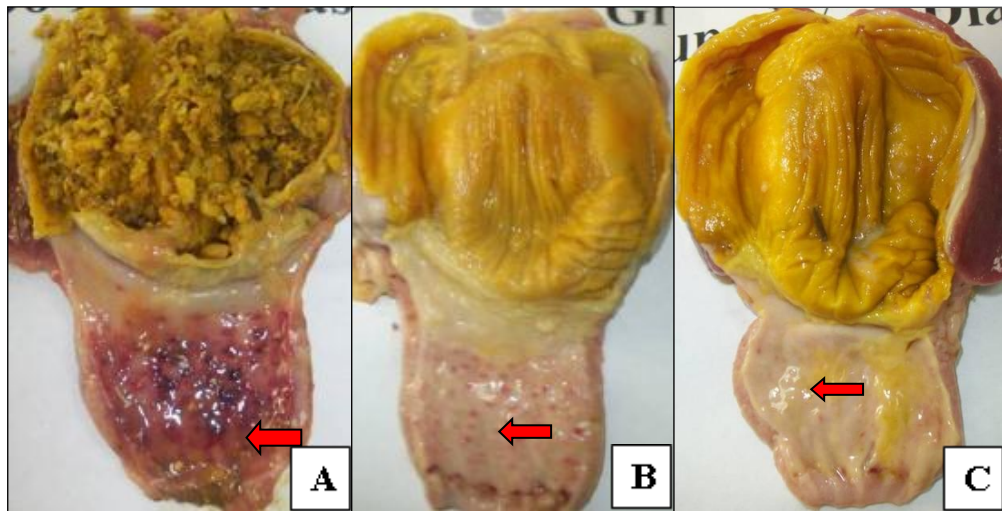


Figura 6. Severa hemorragia difusa (A), moderada hemorragia multifocal (B) y leve hemorragia focal (C) en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post-desafío viral

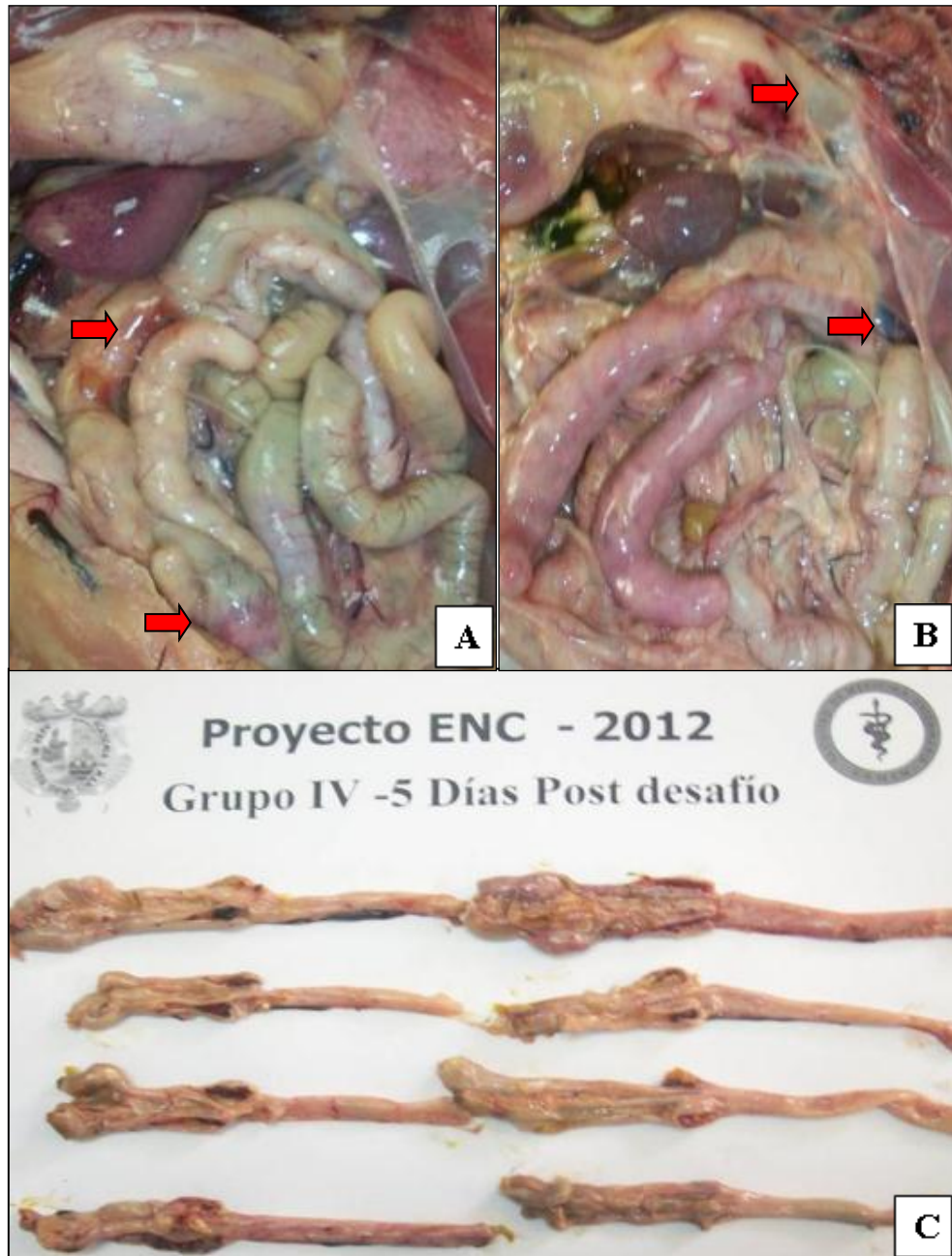


Figura 7. Hemorragia en serosa intestinal (A), proventrículo (B) y en tonsilas cecales (C) en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post-desafío viral

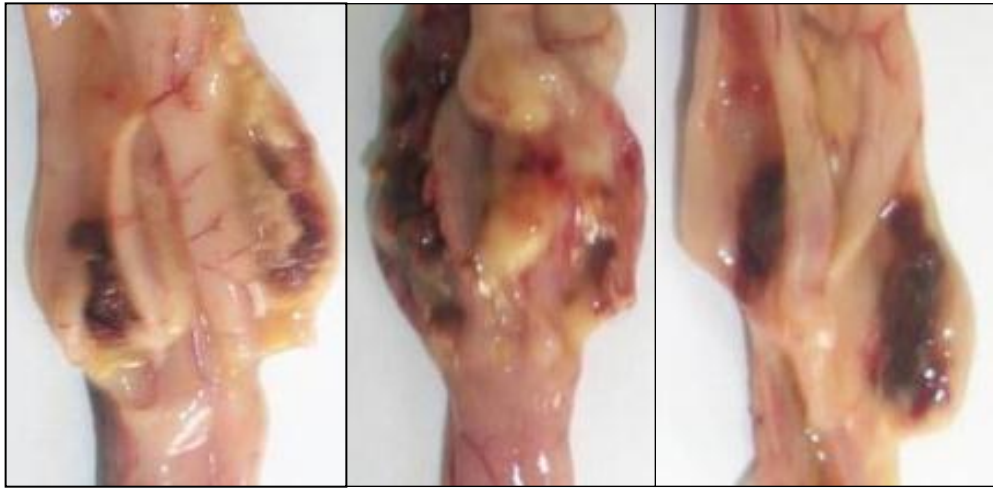


Figura 8. Severa hemorragia en tonsilas cecales en aves del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post-desafío viral

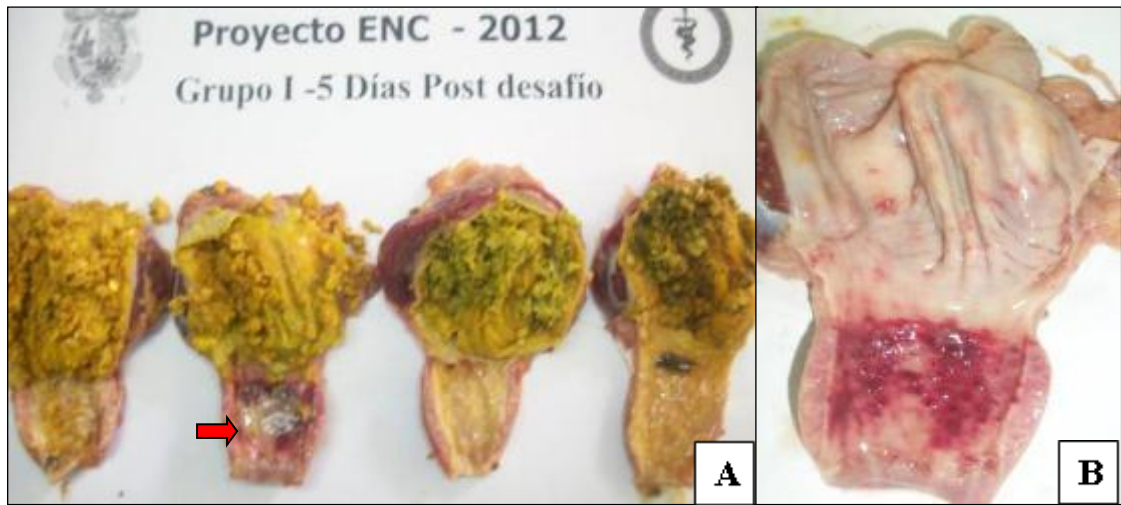


Figura 9. Mollejas con presencia de alimento (A) y severa hemorragia del proventrículo en un ave del tratamiento T4 (control no vacunado) al día 5 post-desafío viral.



Figura 10. Leve a moderada hemorragia en proventrículo en un ave del tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post-desafío viral.

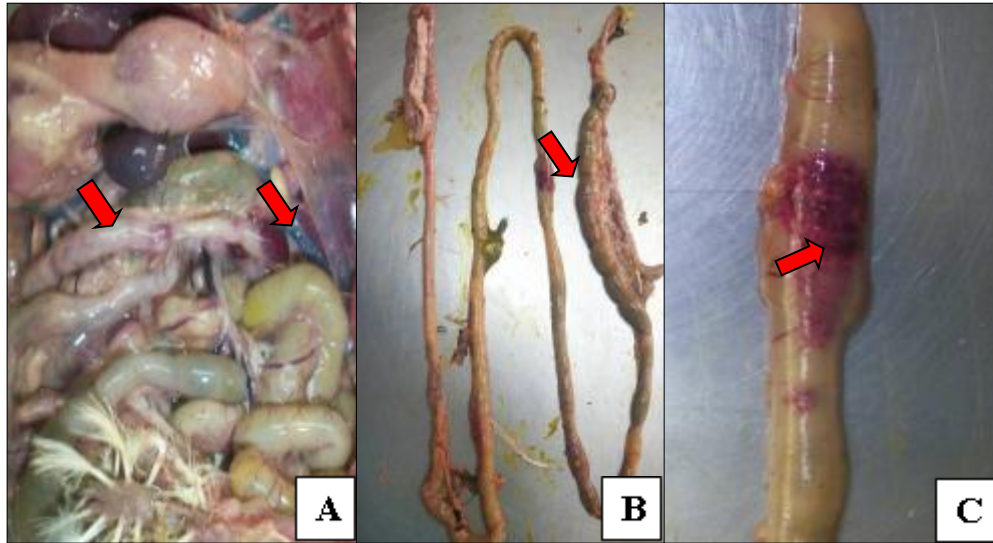


Figura 11. Hemorragia en serosa cecal y tonsilas (A), hemorragia en agregados linfoides del intestino medio (B y C) en aves del tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post-desafío viral.



Figura 12. Severa hemorragia en tonsilas cecales en aves del tratamiento T1 (vacuna viva más inactivada) al día 5 post-desafío viral.



Figura 13. Ausencia de hemorragia en proventrículo de aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post-desafío viral.



Figura 14. Ausencia de hemorragia en agregados linfoides en aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post-desafío viral.



Figura 15. Hemorragias en tonsilas cecales en aves del tratamiento T2 (dos vacunas vivas) al día 5 post-desafío viral.

4. Serología

Los resultados de las pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra el virus de la ENC (ELISA IDEXX) realizadas antes y después del desafío se observan en los Cuadros 22 y 23. Los promedios aritméticos de títulos de anticuerpos (P.A.T) antes del desafío en lotes vacunados y el control, estuvieron entre 83 y 204, incrementándose después del desafío a títulos de entre 4280 y 9037, en los lotes vacunados y desafiados. El grupo control no fue evaluado post desafío porque no existieron sobrevivientes al momento de la evaluación, 42 días de edad.

Cuadro 22. Respuesta serológica contra el virus de la enfermedad de Newcastle mediante ELISA en aves a los 26 días de edad según tratamientos experimentales.

ITEMS	Tratamientos experimentales			
	T1	T2	T3	T4
P.A.T.	204	258	123	83
P.G.T.	141	218	105	53
% C.V.	80.8	50.9	57.5	79.4
MIN	24	70	24	6
MAX	588	512	334	211
Nº Muestras	15	15	15	15

Abreviaturas:

P.A.T: *Promedio Aritmético Título*. **P.G.T:** *Promedio Geométrico Título*, **%C. V:** *Porcentaje Coeficiente de Variación*, **MIN:** *Títulos Mínimos*, **MAX:** *Títulos Máximos*

Tabla 23. Respuesta serológica contra el virus de Newcastle mediante ELISA en aves a los 42 días de edad (post-desafío) según tratamientos experimentales.

ITEMS	Tratamientos experimentales			
	T1	T2	T3	T4
P.A.T.	7811	9037	4280	ND*
P.G.T.	6345	8402	2921	ND*
% C.V.	55.1	30.7	77.5	ND*
MIN	1380	1089	399	ND*
MAX	15193	14262	12617	ND*
Nº Muestras	15	15	15	—

Abreviaturas:

P.A.T: *Promedio Aritmético Título*. **P.G.T:** *Promedio Geométrico Título*, **%C. V:** *Porcentaje Coeficiente de Variación*, **MIN:** *Títulos Mínimos*, **MAX:** *Títulos Máximos*

VII. DISCUSION

Las formas velogénicas de la enfermedad de Newcastle constituyen una amenaza importante para la industria avícola en muchas partes del mundo (Alexander, 1995; Miller y Koch, 2013) porque pueden ocasionar hasta 100% de mortalidad en aves sin protección inmunológica. Varios estudios (Foster et al., 1999; Wambura et al., 2000) han documentado los resultados provechosos de inmunizar a las aves contra el vENC, describiendo una disminución significativa de la morbilidad y la mortalidad. Por ello la inmunización de las aves juntamente con la aplicación de estrictas medidas de bioseguridad, constituyen las dos principales herramientas de prevención de esta enfermedad, tanto en aves de crianza tecnificada como aves de traspatio o riña.

Existe un número considerable de vacunas vivas convencionales contra la ENC para su uso en pollos comerciales y están disponibles en el mercado, estas vacunas han reducido de manera eficiente la incidencia de la enfermedad en granjas avícolas (Boumart et al., 2016). Las cepas lentogénicas de baja virulencia B1 y La Sota son comúnmente usadas en todo el mundo y pueden inducir protección contra la enfermedad si son administradas correctamente a aves sanas y si se permite un tiempo suficiente para una respuesta inmune apropiada antes de la exposición al virus patógeno (Kapczynski, et al., 2013). Las cepas vacunales vivas ocasionan formas muy suaves de enfermedad, conocidas como reacción post vacunal, incluso las cepas más suaves como la Hitchner B1 que puede causar sintomatología leve y podría producir síntomas severos cuando la vacunación se realiza en condiciones medio ambientales adversas o por efecto de otros microorganismos (Alexander, 2001a).

Las vacunas inactivadas son aplicadas principalmente en aves ponedoras y reproductoras con el fin de inducir niveles de anticuerpos altos, uniformes y de larga duración, pero requieren de su aplicación individual (P. Miller and G Koch, 2013). Se creía que las vacunas inactivadas no inducían inmunidad mucosal, sin embargo, estudios realizados en los últimos años indican que las vacunas de virus inactivados con determinados adyuvantes de mucosa pueden estimular la producción local de anticuerpos en el tracto respiratorio y fluidos lacrimales, así como la inducción de anticuerpos sistémicos (Volkova et al, 2014). Todas las cepas de virus de la ENC pertenecen a un solo serotipo por lo que cualquier cepa se puede utilizar como vacuna y todas deberían prevenir los signos clínicos y mortalidad por ENC, sin embargo, algunos estudios han demostrado que las vacunas producidas con cepas de genotipos homólogos al virus de desafío protegen mejor y disminuyen la eliminación del virus de desafío en comparación a las vacunas

con genotipos heterólogos (Miller et al, 2009; Miller et al 2013). Otro tipo de vacunas son las termoestables y es que la ENC es altamente prevalente en regiones tropicales donde continúa extendiéndose en las granjas de aves de corral resultando en un impacto económico negativo; esto se debe en parte a la falta de medidas de bioseguridad, pero también a las malas condiciones de almacenamiento de la vacuna en climas cálidos y a las interrupciones en la cadena de frío durante su distribución y uso. Con el fin de contribuir a la solución de este problema en las comunidades más pobres que dependen de las aves de traspatio para su sustento, se han desarrollado con éxito vacunas termoestables contra la enfermedad de Newcastle como son las cepas V4, el I-2 y TS09-C. (Bensink *et al.*, 1995; Boumart, et al., 2016 Bensink y Spradbrow, 1999).

Los brotes recurrentes de la enfermedad de Newcastle en la industria aviar mundial indican que las vacunas de rutina están fallando (Alexander, 2008), posiblemente los factores que están contribuyendo a que esto ocurra son condiciones medioambientales adversas o deficiencias en el proceso de vacunación, además de la gran virulencia de las cepas actuales que circulan en nuestros países. Rauw et al, 2010, señalan una necesidad que los programas de vacunación se concentren en el primer día de edad para su aplicación masiva, lo que induciría una inmunidad de larga duración, sin necesidad de una vacunación de refuerzo a una edad posterior.

Las vacunas vivas se pueden aplicar por diversas vías, desafortunadamente, las condiciones en el campo a menudo no son óptimas, sobre todo con la aplicación de vacunas vivas en masa, un estudio determinó que solo el 53% del lote fue protegido con la vacunación por la vía spray y 60% por la vía agua de bebida, mientras que el 93% de las aves fueron protegidas por la vía gota ocular individualmente (Degefa et al., 2004).

Así mismo se ha señalado que otros factores y condiciones inmunosupresoras en el campo afectan la eficacia de la vacunación (Perozo et al., 2008). Con el fin de evitar los inconvenientes que ocasiona la vacunación en campo, la avicultura moderna intenta que en pollos de engorde la totalidad de las vacunas sean aplicadas en la planta de incubación donde el proceso de vacunación es más controlado. Esaki M et al, 2013, consideran que el control de la ENC con programas que incluyen vacunas con virus vivos atenuados y vacunas con virus muerto o inactivado presentan inconvenientes, por lo que es necesario considerar vacunas con atributos diferentes a las actuales. Como una estrategia para el control de la ENC, se han desarrollado vacunas utilizando a un herpesvirus de pavo como vector (HVT/ND) que expresa el gene de fusión del virus de la ENC, esta última generación de vacunas contra la ENC, que son las vectorizadas subsanan los inconvenientes que ocurren cuando se vacunan a las aves en campo,

porque la vacuna HVT (Herpes Virus of turkeys por sus siglas en inglés) contra la Enfermedad de Marek tiene que ser aplicada en planta de incubación donde el ambiente está exento de condiciones medioambientales desfavorables y/o agentes inmunosupresivos (Palya et al, 2012).

El presente estudio evaluó, bajo condiciones de desafío experimental, la protección inducida por una vacuna vectorizada (HVT-ND) contra la ENC, aplicada en planta de incubación, comparándola con dos programas de vacunación convencionales con vacunas vivas o viva e inactivada. Inicialmente se comparó la severidad de las reacciones postvacunales obtenidas, los grupos vacunados – T1, T2 y T3 – mostraron reacciones post vacunales audibles como consecuencia de la vacunación, los mismos que se tipificaron como estornudos y ronquera. El grupo no vacunado - T4 – no evidenció reacciones post vacunales. Se pudo observar que los mayores porcentajes de aves con reacción post vacunal y severidad de reacción se observaron en los grupos T1 y T2, no observándose diferencias entre ambos. Estas reacciones posiblemente se debieron a que las dos vacunas vivas contra ENC aplicadas en estos grupos contenían la cepa Villegas Glisson/University of Georgia (VG-GA). Se ha reportado que la cepa VG-GA del virus de la ENC, se replica en ambos, en tracto respiratorio e intestinal (Perozo et al, 2008).

La protección vacunal fue evaluada mediante la mortalidad, manifestaciones clínicas, lesiones y secuelas nerviosas observadas después del desafío con una cepa velogénica viscerotrópica de 1.82 de IPIC. En los cuatro grupos las aves mostraron depresión, diarrea, signos respiratorios y nerviosos. La mortalidad por ENC empezó al 4 d.p.d para el grupo control y al día 5 para los grupos T1 y T2. En el grupo no vacunado todas las aves murieron (100 %) mientras que en los grupos vacunados T1 y T2 la mortalidad fue de 12.5 y 18.4% respectivamente, El grupo T3 vacunado con la vacuna vectorizada tuvo la más baja mortalidad (2%) y fue la más tardía en iniciarse (día 12), aun cuando la cepa de desafío era de un genotipo diferente al de la vacuna, este resultado concuerda con lo reportado por Palya *et al.*, 2012, que señalan que aun existiendo diferencia en la composición genética del gene F del virus de Newcastle en la vacuna vectorizada y el virus del reto (genotipo I y V, respectivamente), las aves vacunadas con la vacuna rHVT contra el virus de ENC tuvieron una buena protección clínica y una reducción significativa en la eliminación del virus de desafío en pollos de engorde. Igualmente ocurrió en otro estudio realizado por Esaki *et al.*, 2013, en una prueba de desafío en aves SPF pero con la cepa velogénica neurotrópica Texas GB (genotipo II), donde se obtuvo una protección del 90% en los lotes vacunados con la vacuna vectorizada HVT/ND (Genotipo I) mientras que en el grupo control ninguna de las aves sobrevivió al desafío.

Con algunas variaciones está comprobada la protección vacunal que inducen los diversos programas de vacunación en pollos de engorde, sin embargo un problema latente en los países donde la enfermedad es endémica es la afectación de la producción de huevos y la calidad de los mismos ocasionada por los virus velogénicos, no existe una vacuna que haya logrado proteger totalmente a las ponedoras de este parámetro. Merino *et al.*, 2012, demostraron la protección a la mortalidad y porcentaje de postura de una vacuna vectorizada HVT/ND frente a un desafío experimental en aves ponedoras comerciales en producción que fueron desafiadas con la cepa mexicana Chimalhuacán, un grupo vacunado con vacuna vectorizada y otro grupo con el programa convencional de viva/oleosa. En ambos grupos se obtuvo protección a la mortalidad pero no a la caída de producción y calidad de huevos, sin embargo, el grupo con vectorizada logró una recuperación de la postura más rápida (3 semanas) y de mayor nivel (de 54,17% a 95%) que el grupo con el programa convencional (5 semanas y de 54,17% a 80%). Este estudio demuestra que la vacuna rHVT/ND logró inducir una buena persistencia de protección.

Varios estudios demuestran la muy buena protección inducida por las vacunas recombinantes para ENC en vector HVT, pero un aspecto crítico en el uso de este tipo de vacunas es el tiempo necesario para que las aves desarrollen inmunidad protectora después de la vacunación, Palya *et al.*, 2012, usando una vacuna recombinante (HVT/ND) aplicada por vía subcutánea o in-ovo a los 18 días de incubación, obtuvieron resultados que difirieron según la edad de desafío, las aves no fueron bien protegidas con la vacuna vectorizada cuando el desafío se hizo a los 20 días de edad, la protección fue de solo 57% y 81%. Contrariamente las aves tuvieron una protección similar a la de nuestro estudio, cuando el desafío se hizo a los 27 días o 40 días con 95% a 100% de sobrevivencia. Por este motivo las aves del presente estudio fueron desafiadas a los 26 días de edad, tal como se ha señalado que es el tiempo aceptable para que las aves desarrollen inmunidad protectora.

Respecto a los signos clínicos por ENC posterior al desafío, los cuatro grupos de aves mostraron algún grado de depresión, diarrea, edema facial, ronquera y secreciones respiratorias, estos signos se iniciaron entre las 48 a 72 horas después del desafío, observándose el pico de manifestaciones a partir del día 5 post desafío. En el grupo control estos signos fueron muy severos y afectaron a más del 80% de las aves en este grupo. En los grupos vacunados, las aves del T3 (vacuna vectorizada) presentaron los menores porcentajes de aves afectadas con signos clínicos; observándose el menor número de aves deprimidas, con edema facial y con ronquera. Signos nerviosos fueron observados en los cuatro grupos de aves, en el grupo control estos se manifestaron como tics, temblores de cabeza y parálisis, finalmente todas las aves de este grupo murieron, mientras que algunas aves de los grupos vacunados que sobrevivieron presentaron

secuelas nerviosas tics, torticollis u opistótonos. La vacuna vectorizada del T3 fue la que mejor protegió a las aves de las secuelas nerviosas habiéndose observado 6% de aves con secuelas nerviosas en comparación al 8 y 10% de los T1 y T2, respectivamente. Resultados similares han sido obtenidos en anteriores estudios (Palya et al, 2012; Esaki M et al, 2013; Merino et al, 2012). Una ventaja adicional que ha sido reportada con el uso de una vacuna vectorizada HVT-ND, gene F insertado en HVT, contra la enfermedad de Newcastle, es la de reducir la eliminación del virus de desafío, disminuyendo su transmisibilidad horizontal (Palya V et al 2012).

Las lesiones de las aves muertas posterior al desafío fueron características a las causadas por los virus velogénicas viscerotrópicas y que han sido reportadas en numerosos estudios (Miller and G. Koch, 2013; Alexander, 2003), estas lesiones consistieron en hemorragias difusas en el proventrículo, molleja, intestinos, y tonsilas cecales; además de esplenomegalia y congestión de bazo. En las aves del grupo control las lesiones hemorrágicas en los agregados linfoides del tracto intestinal fueron muy severas en las aves muertas durante los días 4 y 5 post desafío, también fueron observadas, aunque con menor severidad en las aves muertas de los T1 y T2 a este mismo tiempo. Las aves del T3 con la vacuna vectorizada no presentaron lesiones hemorrágicas en tracto intestinal, probablemente debido a como se ha señalado que estas lesiones pueden estar ausentes en aves desafiadas bien protegidas (Miller and Koch, 2013; Alexander, 2003).

Dentro de los métodos para evidenciar anticuerpos contra el vENC, las pruebas de HI y ELISA son las más comúnmente usadas, mientras que HI detecta anticuerpos dirigidos contra la hemaglutinina, la prueba de ELISA detecta anticuerpos contra todas las proteínas del virus, de otro lado las vacunas vectorizadas incluyen el gen F y no el gen de la HA, por lo tanto, solo inducen anticuerpos neutralizantes y no hemaglutinantes (P. Miller and G Koch, 2013). Una ventaja de la prueba de ELISA es que ha mostrado tener excelente sensibilidad y es muy usada en estudios experimentales con desafío. Esaki et al, 2013, detectaron seroconversión hasta las 50 semanas de edad, en ponedoras vacunadas con la vacuna HVT/ND que fueron protegidas de la mortalidad después del desafío a las 19 semanas de edad (Esaki *et al.*, 2013). En el estudio la respuesta de anticuerpos fue medida por la prueba de ELISA antes y después del desafío. A los 26 días de edad, los promedios aritméticos y geométricos de títulos de anticuerpos en los cuatro grupos fueron muy bajos, en el grupo control no vacunado no se detectaron anticuerpos en ninguno de los sueros, asimismo en los T1 y T2 vacunados con vacunas vivas solo dos sueros tuvieron el título mínimo considerado positivo por la prueba, y el T3 con vectorizada ninguno. Los bajos títulos y promedios de títulos obtenidos en nuestro estudio coinciden con el silencio

inmunológico reportado en aves a esta edad (Davison et al., 2008), pero más bien no concuerdan con lo señalado por Palya et al, 2012, que indican que la respuesta inmune humoral a la vacunación con vacuna vectorizada puede evidenciarse a partir de los 21 y 28 días de edad (Palya et al, 2012). Al final del estudio, 16 días post desafío, los tres grupos vacunados mostraron seroconversión positiva, como consecuencia del reto, los títulos se incrementaron notablemente alcanzando niveles de hasta 15000. El grupo con vectorizada, que fue el de mejor protección, mostró una respuesta serológica más baja que los vacunados con dos vacunas vivas, antes y después del desafío. El grupo control no fue evaluado post desafío porque no existieron sobrevivientes al momento de la evaluación, 42 días de edad.

Los resultados de este estudio demuestran por un lado la muy buena protección a la mortalidad, signos clínicos respiratorios y secuelas nerviosas inducida en pollos de engorde por la vacuna vectorizada y, de otro sugieren que en zonas de alto riesgo el uso de un programa con solo vacunas vivas entéricas no es suficiente para inducir adecuada protección frente a un desafío con cepas muy patogénicas, posiblemente el uso de una vacuna más reactiva tipo La sota en la segunda aplicación en campo hubiese protegido mejor a las aves con este programa.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los tres tratamientos, T1, T2 y T3 tuvieron un efecto protector en las aves en comparación a T4 (control no vacunado) que murió el 100%
2. El porcentaje de mortalidad en las aves del T3 (vacuna vectorizada y una vacuna viva) fue 10.5% menos que en el T1 (vacuna inactivada y dos vacunas vivas) (p-valor = 0.077) y 16.4% menos que en el T2 (dos vacunas vivas) (p-valor = 0.030), siendo el efecto protector del T3 versus el T1 estadísticamente no significativo y el efecto protector del T3 versus el T2 estadísticamente significativo.
3. Los porcentajes de mortalidad entre las aves de T1 y T2 fueron estadísticamente no diferentes (p-valor = 0.427).
4. Con respecto a los signos clínicos post-desafío, los porcentajes de edema facial, secreción y secuelas nerviosas no fueron estadísticamente diferentes entre las aves de los tratamientos experimentales T1, T2 y T3. Los porcentajes de diarrea fueron mayores en las aves del T2 al día 6 (p-valor <0.001) y los porcentajes de ronquera mostraron diferencias significativas entre los tratamientos post-desafío siendo mayores en los T1 y T2 al día 6 (p-valor = 0.002 y p-valor = 0.001 respectivamente).
5. Las aves del tratamiento experimental T1 (dos vacunas vivas y vacuna inactivada) no lograron una protección completa a la presentación de casos de diarrea y ronquera y el T2 vacunado con solo dos vacunas vivas, no logró una protección completa a la mortalidad y a la presentación de casos de diarrea y ronquera, si esto ocurre bajo condiciones experimentales se deduce que, con el uso de solo vacunas vivas entéricas, incluso con la ayuda de una vacuna inactivada no se logra el porcentaje de protección deseado en el campo.
6. Considerando la mortalidad y los menores casos de diarreas y ronquera, la mejor protección vacunal contra la ENC, fue observada en las aves del tratamiento experimental T3,

vacunado al primer día de edad con una vacuna vectorizada (HVT/ENC) y simultáneamente con una vacuna viva entérica.

IX. LITERATURA CITADA

1. **Abolnik C, Horner RF, Bisschop SP, Parker ME, Romito M, Viljoen GJ. 2004.** A phylogenetic study of South African Newcastle disease virus strains isolated between 1990 and 2002 suggests epidemiological origins in the Far East. *Arch Virol* 149: 603-619.
2. **Aldous EW, Alexander DJ. 2001.** Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol* 30: 117-128.
3. **Alexander D. 2003.** Newcastle Disease, Other Avian Paramyxovirus, and Pneumovirus infection. In: Saif, Y. (Ed.), *Disease of Poultry*. Iowa State Press Iowa. pp. 63-99.
4. **Alexander DJ. 1995.** The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J Comp Pathol* 112: 105-126.
5. **Alexander DJ. 2001a.** Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *Br Poult Sci* 42: 5-22.
6. **Alexander DJ, Manvell RJ, Kemp PA, Parsons G, Collins, MS, Brockman S, Russell PH, Lister SA. 1987.** Use of monoclonal antibodies in the characterisation of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. *Avian Pathol* 16: 553-565.
7. **Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP, Frost KM, Collins MS, Russell PH, Smith JE. 1997.** Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 26: 399-418.

8. **Alexander DJ, Russell PH, Collins MS. 1984.** Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterisation of isolated viruses. *Vet Rec* 114: 444-446.
9. **Alexander D. 2001b.** Newcastle disease. *British Poultry Science* 42: 5-22.
10. **Alexander D. 2008.** Newcastle Disease. In: World Organization for Animal Health (OIE) (Ed.), *Manual of Diagnostics Tests and vaccines for Terrestrial Animals*. OIE Paris pp: 576-589.
11. **Awan M, Otte M, James A. 1994.** The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: a review. In: pp 405-423.
12. **Beach J. 1942.** Avian pneumoencephalitis. *Proc Annu Meet US Livestock Sanit Assoc* 46: pp: 203-223.
13. **Beach J. 1944.** The neutralization in vitro of avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. *Science* 100: 361-362.
14. **Beard C, Hanson R. 1981.** Newcastle Disease. In: *Disease of Poultry*. Iowa State University Press Ames Iowa, pp: 452-470.
15. **Bensink Z, Bloch N, Spradbrow PB. 1995.** Approaches to food-based vaccines for domestic chickens. *Vet Microbiol.* 46: 29-35.
16. **Bensink Z, Spradbrow P. 1999.** Newcastle disease virus strain I2--a prospective thermostable vaccine for use in developing countries. *Vet Microbiol* 68: 131-139.
17. **Bermudez A, Stewart-Brown B. 2003.** Disease prevention and diagnostic. In: Saif, Y. (Ed.), *Disease of Poultry*. Iowa State University Press Iowa. pp: 17-55.
18. **Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetskiy I, Zaitceva I, Asanova S, Kydyrmanov A, Daulbaeva K, Shakhvorostova L, Sayatov M, King D. 2009.** Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes* 39: 94-101.
19. **Boumart Z, Hanmdi J, Daouam S, Elarkam A, Omari K and M. El Harrak. 2016.** Thermal Stability Study of Five Newcastle Disease Attenuated Vaccine Strains. *Avian Diseases* 60:779-783.
20. **Brandon Z. Löndt, Dennis J. Alexander. 2016.** Newcastle disease virus and other avian Paramyxoviruses. in: *A Laboratory Manual For the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*. AAAP 6th Edition pp 259 - 266.
21. **Burmester BR, Purchase HG, Okazaki W. 1971.** Long-term experiences with the herpesvirus of turkeys (HVT) as a vaccine against Marek's disease. *Prog Immunobiol Stand* 5: 132-138.

22. **Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ. 1993.** Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol* 128: 363-370.
23. **Collins MS, Strong I, Alexander DJ. 1996.** Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Arch Virol* 141: 635-647.
24. **Cremer KJ, Mackett M, Wohlenberg C, Notkins AL, Moss B. 1985.** Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228: 737-740.
25. **Cross GM. 1991.** Newcastle disease. *Vet Clin. North Am Small Anim Pract* 21: 1231-1239.
26. **Cuello S, Vega A, Noda J. 2011.** Actualizacion sobre la enfermedad de Newcastle. In: pp: 1-30.
27. **Davison F, Kaspers B, Schat KA. 2008.** Avian immunology. London: Academic Press. 481 p.
28. **Degefa T, Dadi L, Yami A, Mariam K and M. Nassir 2004.** Addresses of Technical and Economic Evaluation of Different Methods of Newcastle Disease Vaccine Administration. *J. Vet. Med. A* 51:365–369.
29. **Doyle T. 1927.** A hitherto unrecorded disease of fowls due to filter-passing virus. *Journal of comparative pathology and therapeutics* 40: 144-169.
30. **Doyle T. 1935.** Newcastle disease of fowls. *Journal of comparative pathology and therapeutics* 40: 144-169.
31. **Doyle T. 2014.** A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. In: pp: 144-169.
32. **Esaki M, Godoy A, Rosenberger JK, Rosenberger SC, Gardin Y, Yasuda A, Dorsey KM. 2013.** Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Dis* 57:750-755.
33. **Estola T, Makela P, Hovi T. 1979.** The effect of air ionization on the air-borne transmission of experimental Newcastle disease virus infections in chickens. *J Hyg (Lond)* 83: 59-67.
34. **Fornells LA, Silva TF, Bianchi I, Travassos CE, Liberal MH, Andrade CM, Petrucci MP, Veiga VF, Vaslin MF, Couceiro JN. 2012.** Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. *Vet Microbiol* 156: 429-433.

35. **Foster HA, Chitukuro HR, Tuppa E, Mwanjala T, Kusila C. 1999.** Thermostable Newcastle disease vaccines in Tanzania. *Vet Microbiol* 68: 127-130.
36. **Francis D. 1973.** Newcastle and psittacines. *Poultry Digest* 32: 16-19.
37. **Gallili GE, Ben-Nathan D. 1998.** Newcastle disease vaccines. *Biotechnol Adv* 16: 343-366.
38. **Gueye EH. 2000a.** Women and family poultry production in rural Africa. *Dev Pract* 10: 98-102.
39. **Gueye E. 2000b.** The role of family poultry in poverty alleviation, food security and the promotion of gender equality in rural Africa. *Outlook Agric* 29: 29-36.
40. **Halasz F. 1912.** Contributions to the knowledge of fowlpest. In *Hungarian Royal Veterinary School Paria - Budapest*: pp 1-36.
41. **Hanson R. Brandly C. 1955.** Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. *Science* 122: pp: 156-157.
42. **ICTV 2012.** Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press Waltham.
43. **JORDAN, F. T. W. 1990.** Paramyxoviridae (Newcastle disease and others). En: *Poultry Diseases*. 121-136. 3rd Edition. Bailliere Tindal: Londres.
44. **Kaleta E, Baldauf C. 1988.** Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander D. (Ed.). *Kluwer Academic Publishers Boston* pp: 197-246.
45. **Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. 2013.** Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol* 41: 447-453.
46. **Kapczynski DR, King DJ. 2005a.** Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424-3433.
47. **Kapczynski DR, King DJ. 2005b.** Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23: 3424-3433.
48. **Kapczynski DR, Martin A, Haddad EE, King DJ. 2012.** Protection from clinical disease against three highly virulent strains of Newcastle disease virus after in ovo application of an antibody-antigen complex vaccine in maternal antibody-positive chickens. *Avian Dis* 56: 555-560.

49. **Kraneveld F. 1926a.** A poultry disease in the Dutch East Indies. Ned Indisch Bl Diergeneeskde 38: pp: 448-450.
50. **Kraneveld F. 1926b.** A poultry disease in the Dutch East Indies. Nederlands-Indische Bladen voor Diergeneeskunde 38: 448-450.
51. **Lamb R, Collins D, Kolakofsky J, Melero J, Nagai Y, Olstore M, Pringle C, Rima B. 2000.** Family Paramyxoviridae. In: van Regenmortel, M. (Ed.), Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press New York.
52. **Lancaster J. 1966.** Newcastle disease - a review 1926-1964. In. Canada Department of Agriculture, Ottawa pp: 1-30.
53. **Li X, Chai T, Wang Z, Song C, Cao H, Liu J, Zhang X, Wang W, Yao M, Miao Z. 2009.** Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. Vet Microbiol 136: 226-232.
54. **Lowe RS, Keller PM, Keech BJ, Davison AJ, Whang Y, Morgan AJ, Kieff E, Ellis RW. 1987.** Varicella-zoster virus as a live vector for the expression of foreign genes. Proc Natl Acad Sci U.S.A 84: 3896-3900.
55. **Mackett M, Yilma T, Rose JK, Moss B. 1985.** Vaccinia virus recombinants: expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle. Science 227: 433-435.
56. **Marangon S, Busani L. 2007.** The use of vaccination in poultry production. Rev Sci Tech 26: 265-274.
57. **Martins P. 2003.** Impacto Economico de las enfermedades avicolas de la lista "A" de la OIE. In: Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle.
58. **Mayo M. 2002.** A summary of the changes recently approved by ICTV. Archives of Virology 147: 1655-1656.
59. **McPherson L. 1956.** Some observations on the epizootiology of Newcastle disease. Can J Comp Med 20: 155-168.
60. **Meinert C, Tonascia S. 1986.** Sample sizes and power estimates. In: Meinert, C., Tonascia, S. (Eds.), Clinical Trials, design, conduct, and analysis. Oxford University Press Oxford pp: 71-84.
61. **Merino R, Dueñas D, Soto A, Flores H, Lechuga M. 2012.** Evaluation of recombinant HVT NDV vaccines in laying hens experimentally challenged with the Mexican NDV virulent Chimalchuacan strain. In. pp:10-12.
62. **Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. 2010.** Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. Infect Genet Evol 10: 26-35.

63. **Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez D and D. King. 2009.** Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis.* 53, 39–49.
64. **Miller P, Koch G. 2013.** Newcastle Disease, Other Avian Paramixoviruses, and Metapneumovirus Infections. Newcastle disease. In: *Diseases of Poultry*, 13th Edition. Ed. Glisson, J.R., Mc Dougald, L.R., Nolan, L.K., and D. L. Suarez and Venugopal Nair. Edit. Willey-Blackwell Publishing. Iowa, USA p. 89-107.
65. **Mitchell BW, King DJ. 1994.** Effect of negative air ionization on airborne transmission of Newcastle disease virus. *Avian Dis* 38: 725-732.
66. **Morgan RW, Gelb J, Schreurs CS, Lutticken D, Rosenberger JK, Sondermeijer PJ. 1992.** Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis* 36: 858-870.
67. **Moss B. 1991.** Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* 252: 1662-1667.
68. **Nagai Y, Ogura H, Klenk H. 1976.** Studies on the assembly of the envelope of Newcastle disease virus. *Virology* 69: 523-538.
69. **Nolen RS. 2002.** Exotic Newcastle disease strikes game birds in California. *J Am Vet Med Assoc* 221: 1369-1370.
70. **Off J European Communities, 1992.** Introducing Community measures for the control of Newcastle disease. In: pp: 1-20.
71. **Office International des Epizooties O. 2004.** Newcastle Disease. In: *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE Paris.
72. **Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. 1971.** The temporal relationship between vaccination with the herpesvirus of turkeys and challenge with virulent Marek's disease virus. *Avian Dis* 15: 753-761.
73. **Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. 1973.** Vaccination against Marek's disease: possible causes of failure of herpesvirus of turkeys (strain FC126) to protect chickens against Marek's disease. *Am J Vet Res* 34: 813-817.
74. **Palya V, Kiss I, Tatar-Kis T, Mato T, Felfoldi B, Gardin Y. 2012.** Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. *Avian Dis* 56: 282-287.
75. **Palya V, Tatar-Kis T, Mato T, Felfoldi B, Kovacs E, Gardin Y. 2014.** Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a

turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Vet Immunol Immunopathol* 158: 105-115.

76. **Pedersen JC, Senne DA, Woolcock PR, Kinde H, King DJ, Wise MG, Panigrahy B, Seal BS. 2004.** Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 42: 2329-2334.
77. **Permin A, Riise J, Kryger K, Assoumane I, Schou T. 2004.** Experiences in using poultr as tool for poverty alleviation at village level. In: *FAO/IAEA (Ed.), Interventions and their economic assessment. FAO Vienna* pp: 42-48.
78. **Perozo F, Villegas P, Dolz R, Afonso C and L Purvis. 2008.** The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Pathology* 37(3), 237_245.
79. **Post LE, Roizman B. 1981.** A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: alpha gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* 25: 227-232.
80. **Purchase HG, Okazaki W, Burmester BR. 1972.** Long-term field trials with the herpesvirus of turkeys vaccine against Marek's disease. *Avian Dis* 16: 57-71.
81. **Rauw F, Gardin Y, Palya V, Anbari S, Lemaire S, Boschmans M, van den Berg T, Lambrecht B. 2010.** Improved vaccination against Newcastle disease by an in ovo recombinant HVT-ND combined with an adjuvanted live vaccine at day-old. *Vaccine* 28: 823-833.
82. **Rott R, Klenk H. 1988.** Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In: *Alexander, D. (Ed.), Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston.* pp: 98-112.
83. **Rott R. 1979.** Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. Brief review. *Arch. Virol* 59: 285-298.
84. **Sanchez-Vizcaino F. 2011.** Desarrollo de modelos para el analisis del riesgo de entrada de los virus de Influenza Aviar altamente patogena y la enfermedad de Newcastle en España. In *Universidad Complutense de Madrid.* pp: 1-290.
85. **Senne DA, King DJ, Kapczynski DR. 2004.** Control of Newcastle disease by vaccination. *Dev Biol (Basel)* 119: 165-170.
86. **Shih MF, Arsenakis M, Tiollais P, Roizman B. 1984.** Expression of hepatitis B virus S gene by herpes simplex virus type 1 vectors carrying alpha- and beta-regulated gene chimeras. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 81: 5867-5870.
87. **Sondermeijer PJ, Claessens JA, Jenniskens PE, Mockett AP, Thijssen RA, Willemse MJ, Morgan RW. 1993.** Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens. *Vaccine* 11: 349-358.

88. **Spackman E and C Stephens, 2016.** Virus Isolation and Propagation in Embryonating Eggs. In: A Laboratory Manual For the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens. AAAP 6th Edition pp 259 - 266.
89. **Spradbrow P. 1992.** Newcastle disease respite for poultry. Shell Agriculture 12: pp: 29-31.
90. **Suarez D. 2013.** Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses and Avian Metapneumovirus Infections. In: Swayne, D. (Ed.), Disease of Poultry. Wiley-Blackwell Ames. pp: 89.
91. **Swayne D, King D. 2003.** Avian Influenza and Newcastle disease. J Am Vet Med. pp:2.
92. **Thomsen DR, Marotti KR, Palermo DP, Post LE. 1987.** Pseudorabies virus as a live virus vector for expression of foreign genes. Gene 57: 261-265.
93. **Tumova B, Stumpa A, Janout V, Uvizl M, Chmela J. 1979.** A further member of the Yucaipa group isolated from the common wren (*Troglodytes troglodytes*). Acta Virol 23: 504-507.
94. **Van BM, Bouma A, Fabri TH, Katsma E, Hartog L, Koch G. 2008.** Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathol 37: 1-5.
95. **Volkova MA, Irza AV, Chvala IA, Frolov SF, Drygin V, and D.R. Kapczynski. 2014,** Adjuvant Effects of Chitosan and Calcium Phosphate Particles in an Inactivated Newcastle Disease Vaccine. Avian Diseases. 58:46-52.
96. **Wakamatsu N, King DJ, Kapczynski DR, Seal BS, Brown CC. 2006.** Experimental pathogenesis for chickens, turkeys, and pigeons of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003. Vet Pathol 43: 925-933.
97. **Walker J, Heron B, Mixon M. 1973.** Exotic Newcastle disease eradication programme in the United States of America. Avian Diseases 17: 486-503.
98. **Wambura PN, Kapaga AM, Hyera JM. 2000.** Experimental trials with a thermostable Newcastle disease virus (strain I2) in commercial and village chickens in Tanzania. Prev Vet Med 43: 75-83.
99. **Westbury HA, Parsons G, Allan WH. 1984a.** Comparison of the immunogenicity of Newcastle disease virus strains V4, Hitchner B1 and La Sota in chickens. 2. Tests in chickens with maternal antibody to the virus. Aus Vet J 61: 10-13.

100. **Westbury HA, Parsons G, Allan WH. 1984b.** Duration of excretion of virulent Newcastle disease virus following challenge of chickens with different titres of serum antibody to the virus. *Aust Vet J* 61: 44-46.
101. **Winterfield RW, Dhillon AS. 1981.** Comparative immune response from vaccinating chickens with lentogenic Newcastle disease virus strains. *Poult Sci* 60: 1195-1203.
102. **Winterfield RW, Dhillon AS, Alby LJ. 1980.** Vaccination of chickens against Newcastle disease with live and inactivated Newcastle disease virus. *Poult Sci* 59: 240-246.
103. **Yang XJ, Li WL, Feng Y, Yao JH. 2011.** Effects of immune stress on growth performance, immunity, and cecal microflora in chickens. *Poult Sci* 90: 2740-2746.

X. APENDICE

Tamaño Muestral Mínimo

Anexo 1. Tests for Two Proportions

Numeric Results for Testing Two Proportions using the Z-Test with Unpooled Variance

H0: $P1 - P2 = 0$. H1: $P1 - P2 = D1 \neq 0$.

Target Power	Actual Power*	N1	N2	N	P1	P2	Diff D1	Target Alpha	Actual Alpha*†
0.90	0.90459	30	30	60	0.0030	0.3000	-0.2970	0.0100	0.0133

* Power and actual alpha were computed using binomial enumeration of all possible outcomes.

† Warning: When solving for sample size with power computed using binomial enumeration, the target alpha

level is not guaranteed. Actual alpha may be greater than target alpha in some cases. We suggest that you

investigate sample sizes near the solution to find designs with an actual alpha you are willing to tolerate.

References

- Chow, S.C., Shao, J., and Wang, H. 2008. Sample Size Calculations in Clinical Research, Second Edition. Chapman & Hall/CRC. Boca Raton, Florida.
- D'Agostino, R.B., Chase, W., and Belanger, A. 1988. 'The Appropriateness of Some Common Procedures for Testing the Equality of Two Independent Binomial Populations', The American Statistician, August 1988, Volume 42 Number 3, pages 198-202.
- Fleiss, J. L., Levin, B., and Paik, M.C. 2003. Statistical Methods for Rates and Proportions. Third Edition. John Wiley & Sons. New York.
- Lachin, John M. 2000. Biostatistical Methods. John Wiley & Sons. New York.
- Machin, D., Campbell, M., Fayers, P., and Pinol, A. 1997. Sample Size Tables for Clinical Studies, 2nd Edition. Blackwell Science. Malden, Mass.
- Ryan, Thomas P. 2013. Sample Size Determination and Power. John Wiley & Sons. Hoboken

New Jersey.

Report Definitions

Target Power is the desired power value (or values) entered in the procedure. Power is the probability of rejecting a false null hypothesis.

Actual Power is the power obtained in this scenario. Because N1 and N2 are discrete, this value is often (slightly) larger than the target power. N1 and N2 are the number of items sampled from each population.

N is the total sample size, $N1 + N2$.

P1 is the proportion for Group 1 at which power and sample size calculations are made. This is the treatment or experimental group.

P2 is the proportion for Group 2. This is the standard, reference, or control group.

D1 is the difference $P1 - P2$ assumed for power and sample size calculations.

Target Alpha is the input probability of rejecting a true null hypothesis. Actual Alpha is the value of alpha that is actually achieved.

Summary Statements

Group sample sizes of 30 in group 1 and 30 in group 2 achieve 90.459% power to detect a difference between the group proportions of -0.2970. The proportion in group 1 (the treatment group) is assumed to be 0.3000 under the null hypothesis and 0.0030 under the alternative hypothesis. The proportion in group 2 (the control group) is 0.3000. The test statistic used is the two-sided Z-Test with unpooled variance. The significance level of the test is targeted at 0.0100. The significance level actually achieved by this design is 0.0133.

Anexo 2. Evaluación Mortalidad y Signos Post Desafío

Sialer

ArroygG

2/23/2019

Anexos

Crear directorio de trabajo

```
setwd("~/Documents")
```

1. EVALUACION DE SIGNOS POSTVACUNACION

```
###A. Importar base de datos porcentajes signos post-vacunacion
porcentaje_signos<-read.csv("porcentaje_signos_postdesafio.csv")
porcentaje_signos$Tratamiento<-factor(porcentaje_signos$Tratamiento,
levels=c(1,2,3), labels=c("T1","T2","T3"))
###Kruskal Wallis frecuencia de signos segun tratamientos
kruskal.test(Porcentaje~Tratamiento, data=porcentaje_signos)
```

```
##
## Kruskal-Wallis rank sum test
##
## data: Porcentaje by Tratamiento
## Kruskal-Wallis chi-squared = 1.6494, df = 2, p-value = 0.4384
```

```
###B. Importar base de datos scores de signos post-vacunacion
score<-read.csv("score_postdesafio.csv")
score$Tratamiento<-factor(score$Tratamiento, levels=c(1,2,3),
labels=c("T1","T2","T3"))
###Kruskal Wallis score signos segun tratamientos
kruskal.test(Score_signos~Tratamiento, data=score)
```

```
##
## Kruskal-Wallis rank sum test
##
## data: Score_signos by Tratamiento
## Kruskal-Wallis chi-squared = 1.2985, df = 2, p-value = 0.5225
```

2. EVALUACION DE LA MORTALIDAD POST-DESAFIO

```
####Importar base de datos mortalidad
Mortalidad<-read.csv("data_mortalidad.csv")
Mortalidad
```

```
## Mortalidad Tratamiento Freq
## 1 0 T1 42
## 2 1 T1 6
## 3 0 T2 40
## 4 1 T2 9
## 5 0 T3 49
## 6 1 T3 1
```



```

###Evaluacion de mortalidad entre T1, T2 y Y3
###Modelo1 (T1 referencial)
Model1<- glm(Mortalidad~Tratamiento, weights = Freq, data =
Mortalidad, family = binomial)
summary(Model1)

##
## Call:
## glm(formula = Mortalidad ~ Tratamiento, family = binomial, data =
Mortalidad,
##      weights = Freq)
##
## Deviance Residuals:
##      1      2      3      4      5      6
## -3.349  4.995 -4.029  5.523 -1.407  2.797
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -1.9459     0.4364  -4.459 8.25e-06 ***
## TratamientoT2  0.4543     0.5715   0.795  0.427
## TratamientoT3 -1.9459     1.1004  -1.768  0.077 .
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 101.163  on 5  degrees of freedom
## Residual deviance:  92.712  on 3  degrees of freedom
## AIC: 98.712
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 5

exp(Model1$coefficients)

##      (Intercept) TratamientoT2 TratamientoT3
##      0.1428571      1.5750000      0.1428571

confint(Model1)

## Waiting for profiling to be done...

##              2.5 %      97.5 %
## (Intercept)  -2.9098987 -1.1680883
## TratamientoT2 -0.6532713  1.6248192
## TratamientoT3 -4.9054586 -0.1255915

###Modelo2 (T2 referencial)
DF<-within(Mortalidad, Tratamiento<-relevel(Tratamiento, ref="T2"))
Model2<- glm(Mortalidad~Tratamiento, weights = Freq, data = DF, family
= binomial)
summary(Model2)

##
## Call:
## glm(formula = Mortalidad ~ Tratamiento, family = binomial, data =

```

```

DF,
##      weights = Freq)
##
## Deviance Residuals:
##      1      2      3      4      5      6
## -3.349  4.995 -4.029  5.523 -1.407  2.797
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
## (Intercept)   -1.4917    0.3689  -4.043 5.27e-05 ***
## TratamientoT1 -0.4543    0.5715  -0.795  0.4267
## TratamientoT3 -2.4002    1.0754  -2.232  0.0256 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## (Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
##
##      Null deviance: 101.163  on 5  degrees of freedom
## Residual deviance:  92.712  on 3  degrees of freedom
## AIC: 98.712
##
## Number of Fisher Scoring iterations: 5

exp(Model2$coefficients)

##      (Intercept) TratamientoT1 TratamientoT3
##      0.22500000    0.63492063    0.09070295

confint(Model2)

## Waiting for profiling to be done...

##              2.5 %      97.5 %
## (Intercept)  -2.279621 -0.8154664
## TratamientoT1 -1.624819  0.6532713
## TratamientoT3 -5.335842 -0.6686095

```

3. EVALUACION DE SIGNOS CLINICOS POSTDESAFIO

```

####A. Depression
####Dia 4
Depresion4<-(matrix(c(0,8,2, 48,41,48), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion4)<-c("Yes","No")
colnames(Depresion4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Depresion4,2)

##      T1      T2      T3
## Yes  0 0.1632653 0.04
## No   1 0.8367347 0.96

fisher.test(Depresion4)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##

```

```

## data: Depression4
## p-value = 0.002741
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 6
Depresion6<-(matrix(c(3,7,1,44,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion6)<-c("Yes","No")
colnames(Depresion6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Depresion6,2)

##           T1           T2    T3
## Yes 0.06382979 0.1489362 0.02
## No  0.93617021 0.8510638 0.98

fisher.test(Depresion6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Depression6
## p-value = 0.05419
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 12
Depresion12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion12)<-c("Yes","No")
colnames(Depresion12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Depresion12,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Depresion12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Depresion12
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

####B. Diarreas
####Dia 4
Diarrea4<-(matrix(c(3,7,1,45,42,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea4)<-c("Yes","No")
colnames(Diarrea4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Diarrea4,2)

##           T1           T2    T3
## Yes 0.0625 0.1428571 0.02
## No  0.9375 0.8571429 0.98

fisher.test(Diarrea4)

```

```

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Diarrea4
## p-value = 0.06105
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 6
Diarrea6<-(matrix(c(5,21,4,42,26,46), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea6)<-c("Yes","No")
colnames(Diarrea6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Diarrea6,2)

##           T1           T2    T3
## Yes 0.106383 0.4468085 0.08
## No  0.893617 0.5531915 0.92

fisher.test(Diarrea6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Diarrea6
## p-value = 1.247e-05
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 12
Diarrea12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea12)<-c("Yes","No")
colnames(Diarrea12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Diarrea12,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Diarrea12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Diarrea12
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

####C. Edema facial
####Dia 4
Edema4<-(matrix(c(2,4,0,46,45,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema4)<-c("Yes","No")
colnames(Edema4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Edema4,2)

##           T1           T2    T3
## Yes 0.04166667 0.08163265 0
## No  0.95833333 0.91836735 1

```

```

fisher.test(Edema4)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Edema4
## p-value = 0.1037
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia6
Edema6<-(matrix(c(3,3,0,44,44,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema6)<-c("Yes", "No")
colnames(Edema6)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Edema6,2)

##           T1           T2 T3
## Yes 0.06382979 0.06382979  0
## No  0.93617021 0.93617021  1

fisher.test(Edema6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Edema6
## p-value = 0.19
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia12
Edema12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema12)<-c("Yes", "No")
colnames(Edema12)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Edema12,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Edema12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Edema12
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

####D. Secrecion
####Dia 4
Secrecion4<-(matrix(c(4,4,7,44,45,43), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secrecion4)<-c("Yes", "No")
colnames(Secrecion4)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Secrecion4,2)

```

```

##           T1           T2   T3
## Yes 0.08333333 0.08163265 0.14
## No  0.91666667 0.91836735 0.86

fisher.test(Secrecion4)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Secrecion4
## p-value = 0.6549
## alternative hypothesis: two.sided

###Dia 6
Secrecion6<-(matrix(c(3,2,10,44,45,40), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secrecion6)<-c("Yes","No")
colnames(Secrecion6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secrecion6,2)

##           T1           T2   T3
## Yes 0.06382979 0.04255319 0.2
## No  0.93617021 0.95744681 0.8

fisher.test(Secrecion6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Secrecion6
## p-value = 0.03065
## alternative hypothesis: two.sided

###Dia 12
Secrecion12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secrecion12)<-c("Yes","No")
colnames(Secrecion12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secrecion12,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Secrecion12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Secrecion12
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

###E. Ronquera
###Dia 4
Ronquera4<-(matrix(c(3,4,15,45,45,35), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Ronquera4)<-c("Yes","No")

```

```

colnames(Ronquera4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera4,2)

##           T1           T2   T3
## Yes 0.0625 0.08163265 0.3
## No  0.9375 0.91836735 0.7

fisher.test(Ronquera4)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Ronquera4
## p-value = 0.001954
## alternative hypothesis: two.sided

###Dia 6
Ronquera6<-(matrix(c(29,27,14,18,20,36), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Ronquera6)<-c("Yes","No")
colnames(Ronquera6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera6,2)

##           T1           T2   T3
## Yes 0.6170213 0.5744681 0.28
## No  0.3829787 0.4255319 0.72

fisher.test(Ronquera6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Ronquera6
## p-value = 0.001226
## alternative hypothesis: two.sided

###Dia 12
Ronquera12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Ronquera12)<-c("Yes","No")
colnames(Ronquera12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera12,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Ronquera12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data: Ronquera12
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

```

```

####F. Secuelas nerviosas
####Dia 4
Secuela4<-(matrix(c(0,0,0,48,49,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela4)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela4,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Secuela4)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data:  Secuela4
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 6
Secuela6<-(matrix(c(0,0,0,47,47,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela6)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela6,2)

##      T1 T2 T3
## Yes  0  0  0
## No   1  1  1

fisher.test(Secuela6)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data:  Secuela6
## p-value = 1
## alternative hypothesis: two.sided

####Dia 12
Secuela12<-(matrix(c(3,2,3,39,38,46), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela12)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela12,2)

##           T1   T2   T3
## Yes 0.07142857 0.05 0.06122449
## No  0.92857143 0.95 0.93877551

fisher.test(Secuela12)

##
## Fisher's Exact Test for Count Data
##
## data:  Secuela12

```



```
## p-value = 1  
## alternative hypothesis: two.sided
```

```

####Anexos
####Crear directorio de trabajo
setwd("~/Documents")

###1. EVALUACION DE SIGNOS POSTVACUNACION
###A. Importar base de datos porcentajes signos post-vacunacion
porcentaje_signos<-read.csv("porcentaje_signos_postdesafio.csv")
porcentaje_signos$Tratamiento<-
factor(porcentaje_signos$Tratamiento, levels=c(1,2,3),
labels=c("T1","T2","T3"))
###Kruskal Wallis frecuencia de signos segun tratamientos
kruskal.test(Porcentaje~Tratamiento, data=porcentaje_signos)

###B. Importar base de datos scores de signos post-vacunacion
score<-read.csv("score_postdesafio.csv")
score$Tratamiento<-factor(score$Tratamiento, levels=c(1,2,3),
labels=c("T1","T2","T3"))
###Kruskal Wallis score signos segun tratamientos
kruskal.test(Score_signos~Tratamiento, data=score)

###2. EVALUACION DE LA MORTALIDAD POST-DESAFIO
####Importar base de datos mortalidad
Mortalidad<-read.csv("data_mortalidad.csv")
Mortalidad
###Evaluacion de mortalidad entre T1, T2 y Y3
###Modelo1 (T1 referencial)
Model1<- glm(Mortalidad~Tratamiento, weights = Freq, data =
Mortalidad, family = binomial)
summary(Model1)
exp(Model1$coefficients)
confint(Model1)
###Modelo2 (T2 referencial)
DF<-within(Mortalidad, Tratamiento<-relevel(Tratamiento, ref="T2"))
Model2<- glm(Mortalidad~Tratamiento, weights = Freq, data = DF,
family = binomial)
summary(Model2)
exp(Model2$coefficients)
confint(Model2)

###3. EVALUACION DE SIGNOS CLINICOS POSTDESAFIO
###A. Depresion
###Dia 4
Depresion4<-(matrix(c(0,8,2, 48,41,48), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion4)<-c("Yes","No")
colnames(Depresion4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Depresion4,2)
fisher.test(Depresion4)

###Dia 6
Depresion6<-(matrix(c(3,7,1,44,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion6)<-c("Yes","No")
colnames(Depresion6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Depresion6,2)
fisher.test(Depresion6)

```

```

###Dia 12
Depresion12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Depresion12)<-c("Yes", "No")
colnames(Depresion12)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Depresion12,2)
fisher.test(Depresion12)

###B. Diarreas
###Dia 4
Diarrea4<-(matrix(c(3,7,1,45,42,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea4)<-c("Yes", "No")
colnames(Diarrea4)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Diarrea4,2)
fisher.test(Diarrea4)

###Dia 6
Diarrea6<-(matrix(c(5,21,4,42,26,46), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea6)<-c("Yes", "No")
colnames(Diarrea6)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Diarrea6,2)
fisher.test(Diarrea6)

###Dia 12
Diarrea12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Diarrea12)<-c("Yes", "No")
colnames(Diarrea12)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Diarrea12,2)
fisher.test(Diarrea12)

###C. Edema facial
###Dia 4
Edema4<-(matrix(c(2,4,0,46,45,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema4)<-c("Yes", "No")
colnames(Edema4)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Edema4,2)
fisher.test(Edema4)

###Dia6
Edema6<-(matrix(c(3,3,0,44,44,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema6)<-c("Yes", "No")
colnames(Edema6)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Edema6,2)
fisher.test(Edema6)

###Dia12
Edema12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Edema12)<-c("Yes", "No")
colnames(Edema12)<-c("T1", "T2", "T3")
prop.table(Edema12,2)
fisher.test(Edema12)

###D. Secrecion
###Dia 4
Secrecion4<-(matrix(c(4,4,7,44,45,43), ncol=3, byrow=TRUE))

```

```

rownames(Secrecion4)<-c("Yes","No")
colnames(Secrecion4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secrecion4,2)
fisher.test(Secrecion4)

###Dia 6
Secrecion6<-(matrix(c (3, 2,10,44,45, 40), ncol=3, byrow=TRUE))
Rownames (Secrecion6) <-c ("Yes", "No")
Colnames (Secrecion6) <-c ("T1","T2","T3")
prop.table (Secrecion6, 2)
Fisher. Test (Secrecion6)

###Die 12
Secrecion12<-(matrix(c (0, 0, 0, 42, 40, 49), no=3, brow=TRUE))
Rownames (Secrecion12) <-c ("Yes", "No")
Colnames (Secrecion12) <-c ("T1","T2","T3")
prop.table (Secrecion12, 2)
Fisher. Test (Secrecion12)

###E. Ronquera
###Die 4
Ronquera4<-(matrix(c (3, 4, 15, 45, 45, 35), no=3, brow=TRUE))
rownames(Ronquera4)<-c("Yes","No")
colnames(Ronquera4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera4,2)
fisher.test(Ronquera4)

###Dia 6
Ronquera6<-(matrix(c(29,27,14,18,20,36), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Ronquera6)<-c("Yes","No")
colnames(Ronquera6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera6,2)
fisher.test(Ronquera6)

###Dia 12
Ronquera12<-(matrix(c(0,0,0,42,40,49), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Ronquera12)<-c("Yes","No")
colnames(Ronquera12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Ronquera12,2)
fisher.test(Ronquera12)

###F. Secuelas nerviosas
###Dia 4
Secuela4<-(matrix(c(0,0,0,48,49,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela4)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela4)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela4,2)
fisher.test(Secuela4)

###Dia 6
Secuela6<-(matrix(c(0,0,0,47,47,50), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela6)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela6)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela6,2)
fisher.test(Secuela6)

```

```
###Dia 12
Secuela12<-(matrix(c(3,2,3,39,38,46), ncol=3, byrow=TRUE))
rownames(Secuela12)<-c("Yes","No")
colnames(Secuela12)<-c("T1","T2","T3")
prop.table(Secuela12,2)
```

Anexo 3. Data Mortalidad

Mortalidad	Tratamiento	Freq
0	T1	42
1	T1	6
0	T2	40
1	T2	9
0	T3	49
1	T3	1

Anexo 4. Evaluaciones diarias de mortalidad y signos clínico post desafío.

Tratamiento I

Mortalidad 12.5% - 6 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x																
2						x															
3						x															
4							x														
5							x														
6								x													
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					

Depresión 14.6 % - 7 aves

ID	Dias Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x																
2						x															
3						x															
4						x															
5							x														
6							x														
7								x													
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					

Diarreas 45.8 % - 22 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2						x															
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5							x	x													
6						x	x														
7						x	x	x													
8																					
9							x	x	x	x											
10								x	x	x											
11																					
12																					
13								x	x	x											
14								x			x										
15																					
16																					
17								x	x												
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24							x	x													
25																					
26																					
27							x	x	x	x											
28																					
29																					
30																					
31							x	x	x		x										
32																					
33																					
34																					
35																					
36							x	x	x	x											
37																					
38																					
39							x	x	x												
40							x	x	x	x											
41							x	x	x	x											
42																					
43							x	x	x												
44																					
45							x	x	x												
46																					
47							x	x	x	x											
48																					

Edema facial 8.3 % - 4 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2																					
3				x	x	x															
4																					
5					x	x	x														
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14						x	x	x													
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					

Secreciones 12.5% - 6 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2																					
3				x	x	x															
4																					
5					x	x	x														
6																					
7			x	x																	
8			x	x	x																
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14						x	x	x													
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					

Ronquera 66.7% - 32 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2						x	x														
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5							x	x													
6						x	x														
7						x	x	x													
8					x	x	x	x													
9					x	x	x	x													
10						x	x	x													
11							x	x	x												
12																					
13						x	x	x													
14						x	x														
15																					
16																					
17						x	x	x													
18					x	x															
19						x	x	x													
20						x	x														
21					x	x	x														
22																					
23																					
24						x	x														
25																					
26																					
27						x	x	x	x												
28																					
29																					
30																					
31						x	x	x													
32					x	x	x														
33						x	x	x													
34					x	x	x	x													
35						x	x	x													
36						x	x	x	x												
37																					
38																					
39						x	x	x													
40						x	x	x	x												
41						x	x	x	x												
42																					
43						x	x	x													
44																					
45						x	x	x													
46																					
47						x	x	x	x												
48																					

Secuelas nerviosas 8.3% - 4 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1								x	x	x	x	x									
2																					
3										x	x	x									
4																					
5											x	x	x								
6																					
7									x	x											
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					

Tratamiento II

Mortalidad 18.4% - 9 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x																
2					x																
3						x															
4						x															
5						x															
6						x															
7							x														
8							x														
9								x													
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					

Depresión 20.4% - 10 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x	x																
2				x	x	x															
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5				x	x	x															
6				x	x	x															
7					x	x	x														
8		x	x	x	x																
9																					
10		x	x	x	x	x	x	x													
11								x	x	x	x										
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					

Diarreas 53.3 % - 26 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x	x																
2				x	x	x															
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5				x	x	x															
6				x	x	x															
7					x	x	x														
8		x	x	x	x																
9																					
10							x	x													
11																					
12																					
13							x	x													
14																					
15																					
16																					
17					x	x	x														
18																					
19																					
20						x	x														
21																					
22																					
23																					
24					x	x															
25																					
26																					
27					x	x															
28																					
29																					
30																					
31					x	x															
32																					
33																					
34																					
35																					
36					x	x															
37																					
38																					
39					x	x															
40					x	x															
41					x	x															
42					x	x															
43						x	x	x													
44					x	x															
45						x	x	x													
46					x	x															
47					x	x															
48							x	x													
49																					

Edema facial 8.2 % - 4 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x	x																
2				x	x	x															
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					

Secreciones 8.2% - 4 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x																	
2				x	x																
3				x	x	x															
4				x	x	x															
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					

Ronquera 61.2% - 30 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x	x	x														
2						x	x	x													
3						x	x	x													
4						x	x	x													
5						x	x	x													
6						x	x	x													
7							x	x	x												
8		x	x	x	x																
9																					
10					x	x	x														
11																					
12																					
13						x	x														
14																					
15					x	x	x														
16																					
17				x	x	x															
18																					
19																					
20					x	x															
21																					
22																					
23																					
24				x	x																
25					x	x	x														
26																					
27					x	x	x														
28																					
29																					
30																					
31					x	x	x														
32																					
33					x	x	x														
34																					
35																					
36					x	x	x														
37																					
38					x	x	x														
39					x	x	x														
40						x	x	x													
41					x	x	x														
42					x	x	x														
43						x	x														
44					x	x	x														
45					x	x	x														
46					x	x	x														
47						x	x														
48				x	x	x	x	x													
49																					

Secuelas nerviosas 10.2 % - 5 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2																					
3																					
4								x	x	x											
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11									x	x	x	x	x								
12																					
13									x	x	x	x									
14																					
15																					
16																					
17									x												
18																					
19																					
20									x	x	x										
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					

Tratamiento III

Mortalidad 2.0 % - 1 ave

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1												x									
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Depresión 6.1 % - 3 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1		x	x	x	x	x															
2		x	x	x	x																
3		x	x																		
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Diarreas 16.3 % - 8 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x	x															
2		x	x																		
3		x	x																		
4				x	x	x															
5		x	x																		
6		x	x																		
7						x															
8						x	x														
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Edema facial 6.1 % - 3 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1									x	x											
2									x												
3																					
4									x	x											
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16																					
17																					
18																					
19																					
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Secreciones 24.5% - 12 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2				x	x	x															
3																					
4			x	x	x	x															
5				x	x	x															
6					x	x	x														
7																					
8					x	x															
9																					
10					x	x															
11																					
12					x	x	x														
13				x	x																
14																					
15					x	x															
16				x	x	x	x														
17																					
18			x	x	x																
19			x	x	x	x															
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Ronquera 44.9% - 22 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x	x	x														
2				x	x	x															
3																					
4		x	x	x	x																
5				x	x	x															
6					x	x	x														
7																					
8					x	x															
9																					
10					x	x															
11																					
12					x	x	x														
13				x	x																
14																					
15					x	x															
16				x	x	x	x														
17																					
18			x	x	x																
19			x	x	x	x															
20				x	x	x	x														
21																					
22				x	x																
23			x	x	x																
24				x	x	x															
25				x	x	x															
26				x	x																
27		x	x	x																	
28			x	x	x																
29					x	x															
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Secuelas nerviosas 6.2 % - 3 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2																					
3																					
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9									x	x	x	x	x	x	x						
10																					
11																					
12																					
13																					
14																					
15																					
16									x	x	x	x	x	x	x						
17																					
18																					
19																					
20									x	x	x	x	x	x	x						
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					

Tratamiento IV

Mortalidad 100.0 % - 50 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1					x																
2					x																
3					x																
4				x																	
5				x																	
6					x																
7					x																
8					x																
9					x																
10				x																	
11				x																	
12					x																
13					x																
14					x																
15					x																
16					x																
17						x															
18						x															
19						x															
20						x															
21						x															
22						x															
23						x															
24						x															
25						x															
26						x															
27						x															
28						x															
29						x															
30						x															
31						x															
32						x															
33						x															
34						x															
35						x															
36						x															
37						x															
38							x														
39							x														
40							x														
41							x														
42							x														
43							x														
44							x														
45							x														
46							x														
47							x														
48							x														
49								x													
50									x												

Depresión 100 % - 50 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x	x																
2			x	x	x																
3			x	x	x																
4		x	x	x																	
5		x	x	x																	
6			x	x	x																
7			x	x	x																
8			x	x	x																
9			x	x	x																
10		x	x	x																	
11		x	x	x																	
12			x	x	x																
13			x	x	x																
14			x	x	x																
15			x	x	x																
16			x	x	x																
17			x	x	x																
18		x	x	x																	
19		x	x	x																	
20		x	x	x																	
21		x	x	x																	
22		x	x	x																	
23		x	x	x																	
24		x	x	x																	
25		x	x	x																	
26			x	x	x																
27			x	x	x																
28			x	x	x																
29			x	x	x																
30			x	x	x																
31			x	x	x																
32		x	x	x																	
33			x	x	x																
34		x	x	x																	
35		x	x	x																	
36			x																		
37		x	x	x																	
38		x	x	x																	
39			x	x	x																
40			x	x	x																
41		x	x	x																	
42			x	x	x																
43		x	x	x																	
44		x	x	x																	
45		x	x	x																	
46			x	x	x																
47			x	x	x																
48		x	x	x																	
49			x	x	x																
50		x	x	x																	

Diarreas 85.7 % - 43 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1			x	x	x																
2			x	x	x																
3			x	x	x																
4		x	x	x																	
5		x	x	x																	
6			x	x	x																
7			x	x	x																
8			x	x	x																
9			x	x	x																
10		x	x	x																	
11		x	x	x																	
12			x	x	x																
13			x	x	x																
14			x	x	x																
15			x	x	x																
16			x	x	x																
17			x	x	x																
18		x	x	x																	
19		x	x	x																	
20		x	x	x																	
21		x	x	x																	
22		x	x	x																	
23		x	x	x																	
24		x	x	x																	
25																					
26			x	x	x																
27			x	x	x																
28			x	x	x																
29			x	x	x																
30			x	x	x																
31			x	x	x																
32																					
33			x	x	x																
34																					
35		x	x	x																	
36			x																		
37																					
38		x	x	x																	
39																					
40			x	x	x																
41		x	x	x																	
42			x	x	x																
43		x	x	x																	
44		x	x	x																	
45																					
46			x	x	x																
47			x	x	x																
48																					
49			x	x	x																
50		x	x	x																	

Edema facial 95.9 % - 48 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2																					
3																					
4				x																	
5				x																	
6				x	x																
7				x	x																
8				x	x																
9				x	x																
10				x																	
11				x																	
12				x	x																
13				x	x																
14				x	x																
15				x	x																
16				x	x																
17				x	x																
18				x																	
19				x																	
20				x																	
21				x																	
22				x																	
23				x																	
24				x																	
25				x																	
26				x	x																
27				x	x																
28				x	x																
29				x	x																
30				x	x																
31				x	x																
32				x																	
33				x	x																
34				x																	
35				x																	
36				x	x																
37				x																	
38				x																	
39				x	x																
40				x	x																
41				x																	
42				x	x																
43				x																	
44				x																	
45				x																	
46				x	x																
47				x	x																
48				x																	
49				x	x																
50				x																	

Secreciones 77.6% - 39 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2																					
3																					
4																					
5				x																	
6			x	x																	
7			x	x																	
8			x	x																	
9			x	x																	
10				x																	
11			x																		
12				x	x	x	x														
13																					
14			x	x																	
15			x	x																	
16			x	x																	
17			x	x																	
18			x																		
19			x																		
20			x																		
21			x																		
22			x																		
23			x																		
24			x																		
25																					
26			x	x																	
27			x	x																	
28				x	x	x															
29			x	x																	
30			x	x																	
31																					
32				x	x	x															
33				x	x																
34																					
35																					
36																					
37			x																		
38			x																		
39			x		x	x															
40		x	x																		
41		x																			
42		x	x																		
43																					
44		x																			
45																					
46		x	x																		
47		x	x																		
48				x																	
49			x	x																	
50				x																	

Ronquera 67.3% - 34 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1				x	x																
2																					
3																					
4				x																	
5				x																	
6			x	x																	
7			x	x																	
8																					
9			x	x																	
10				x																	
11			x																		
12				x	x	x															
13																					
14			x	x																	
15			x	x																	
16																					
17			x	x																	
18			x																		
19			x																		
20			x																		
21			x																		
22			x																		
23			x																		
24			x																		
25																					
26			x	x																	
27			x	x																	
28				x																	
29																					
30			x	x																	
31																					
32				x																	
33				x	x																
34																					
35																					
36																					
37			x																		
38			x																		
39			x		x																
40																					
41		x																			
42		x	x																		
43																					
44		x																			
45																					
46		x	x																		
47		x	x																		
48																					
49			x	x																	
50																					

Secuelas nerviosas 12.2 % - 6 aves

ID	Días Post Infección																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1																					
2				x	x																
3				x	x																
4																					
5																					
6																					
7																					
8																					
9																					
10				x	x																
11																					
12					x																
13																					
14																					
15																					
16				x	x																
17																					
18																					
19				x	x																
20																					
21																					
22																					
23																					
24																					
25																					
26																					
27																					
28																					
29																					
30																					
31																					
32																					
33																					
34																					
35																					
36																					
37																					
38																					
39																					
40																					
41																					
42																					
43																					
44																					
45																					
46																					
47																					
48																					
49																					
50																					